

**DANIELLE ANDRADE DA SILVA DANTAS**

**Avaliação do papel da matriz extracelular na musculatura  
da parede lateral da faringe na fisiopatologia da síndrome  
da apnéia obstrutiva do sono**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Otorrinolaringologia  
Orientador: Prof. Dr. Michel Burihan Cahali

São Paulo  
2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Dantas, Danielle Andrade da Silva

Avaliação do papel da matriz extracelular na musculatura da parede lateral da faringe na fisiopatologia da síndrome da apnéia obstrutiva do sono / Danielle Andrade da Silva Dantas. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

Área de concentração: Otorrinolaringologia.

Orientador: Michel Burihan Cahali.

Descritores: 1.Apnéia do sono tipo obstrutiva 2.Matriz extracelular 3.Faringe  
4.Músculo esquelético 5.Orofaringe

USP/FM/SBD-091/09

## DEDICATÓRIA

Ao meu querido pai, **Elisio Virgolino da Silva**, que me ensinou que apesar das dificuldades, o caminho deve sempre seguido sempre em frente, com otimismo e cabeça erguida.

À minha amada mãe, **Maria Antonia Andrade da Silva**, pela grande amizade, pelo carinho e apoio incessante em todos os momentos da minha vida, especialmente este.

Ao meu marido, **Gustavo Coelho Dantas**, pela grande ajuda durante toda esta caminhada científica, sem o qual não seria possível a conclusão desta tese. Eu te amo.

Aos meus filhos, **Clara** , e o **próximo(a)** que está a caminho, por dar sentido à minha vida e enchê-la de alegria e vivacidade.

Aos meus queridos irmãos, **Nicenia, Patrícia e Elisio Filho**, pela amizade e a confiança do apoio em todas as ocasiões.

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Michel Burihan Cahali**, orientador desta tese, ao qual tenho grande admiração, agradeço a confiança em mim depositada e a imensa dedicação e ajuda na realização desta tese.

À **Prof. Dra. Thais Mauad**, chefe do Lim 5 do Departamento de Patologia, que considero minha co-orientadora, testemunho sua grande competência no campo da pesquisa e exemplo de humanidade, sem a qual esta pesquisa não teria sido realizada.

Ao **Prof Dr. Ricardo Ferreira Bento**, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de ingressar nesta pós- graduação.

Ao **Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes**, Coordenador do Programa de Pós- graduação em Otorrinolaringologia da Faculdade de medicina da USP, pelo incentivo à pesquisa e dedicação aos pós-graduandos.

Aos **Prof. Dr. Domingos Tsuji, Prof. Dra. Renata Di Francesco, Dr. Rui Imamura**, pelas valiosas e pertinentes sugestões no exame de qualificação.

Ao Dr. **Luiz Fernando Ferraz da Silva**, pela grande contribuição na análise estatística e sua grande disposição sempre a ajudar a todos.

Ao **Prof. Dr. Geraldo Lorenzi-Filho**, chefe do departamento da Pneumologia e do Laboratório do sono do Incor, e toda sua equipe, especialmente, a **Bianca**, pela grande ajuda na realização das polissonografias.

Ao **Dr. Gilberto Formigini**, pelas sugestões e orientações durante todo o andamento desta tese.

Aos colegas da pós-graduação, especialmente **Raquel Tavares, Rogério Buhler** pelo companheirismo e troca de informações científicas durante toda esta caminhada.

Aos **médicos residentes** da Otorrinolaringologia que me ajudaram na realização das cirurgias dos pacientes.

À **Ângela Santos e Maria Cristina Medeiros**, pela contribuição na realização da imunohistoquímica, além da grande disposição e simpatia em ajudar.

Aos funcionários do Museu de imagem e som do departamento da Patologia, **D. Ana e Reginaldo** que sempre com muita gentileza me acolheram, durante o longo período da análise das lâminas.

Às **técnicas** do laboratório de histoquímica, pela contribuição na realização das colorações, e caloroso acolhimento.

A todos os colegas do Departamento de Patologia Pulmonar, pela amizade que construímos, além de grande ajuda no manuseio dos equipamentos de fotografia e análise histológica e disponibilização da sala do museu, em especial **Bianca, Maína e Tatiana Lanças**.

À **Jacira, Jorge, Luci, Lúcia, Márcia e Marileide**, funcionários da Clínica de Otorrinolaringologia do HCFMUSP, que sempre me auxiliaram com muita delicadeza, e desfrutamos momentos agradáveis.

Aos meus demais familiares, sobrinhos, cunhados, tios, sogros (Maria Helena e Henrique Dantas) e Carmen Dantas por estarem sempre prontos a me ajudar e contribuindo com a conclusão desta tese.

O esforço é grande e o homem é pequeno...

A alma é divina e a obra é imperfeita.

Este sinal assinala ao vento e aos céus

Que, da obra ousada, é minha a parte feita:

O por fazer é só com Deus.

Fernando Pessoa<sup>\*</sup>

---

<sup>\*</sup> Pessoa, F. Mensagem, coleção a obra-prima de cada autor. São Paulo: Ed Martin Claret; 2002.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por: Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli CRestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e documentação; 2005.

# SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Resumo

Summary

Artigo científico

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Objetivos .....	7
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	8
2.1	Estrutura da parede lateral da faringe.....	9
2.2	Epidemiologia da SAOS e tratamento cirúrgico .....	11
2.3	Papel da musculatura da parede lateral da faringe na fisiopatologia da SAOS.....	12
2.4	Alterações histológicas na musculatura da via aérea superior .....	15
2.5	Papel da matriz extracelular (MEC) no músculo esquelético .....	17
2.5.1	Papel das fibras colágenas no músculo esquelético .....	19
2.5.2	Papel das fibras elásticas no músculo esquelético.....	22
2.5.3	Papel dos proteoglicanos no músculo esquelético.....	24
2.5.4	Papel das metaloproteinases da matriz no músculo esquelético .....	26
2.5.5	Papel da fibronectina no músculo esquelético.....	28
2.6	Alterações da MEC do músculo esquelético no envelhecimento .....	30
3	MÉTODOS.....	32
3.1	Casuística .....	33
3.1.1	Critérios de inclusão .....	33
3.1.2	Critérios de exclusão .....	35



3.2	Método .....	35
3.2.1	Avaliação pré-operatória .....	35
3.2.2	Procedimentos cirúrgicos .....	37
3.2.3	Avaliação da matriz extracelular .....	38
3.2.3.1	Preparações histológicas e reação imunohistoquímica .....	38
3.2.3.2	Análise morfológica .....	42
3.2.4	Metodologia estatística .....	43
4	RESULTADOS .....	44
5	DISCUSSÃO .....	53
6	CONCLUSÕES .....	61
7	REFERÊNCIAS .....	63

Apêndices

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Preparação das tonsilas palatinas após ressecção.....	39
<b>FIGURA 2</b> - Foto do analisador de imagem.....	43
<b>FIGURA 3</b> - Corte histológico corado com Hematoxilina e eosina.....	46
<b>FIGURA 4</b> - Corte histológico transversal de imunohistoquímica mostrando o colágeno I .....	47
<b>FIGURA 5</b> - Corte histológico transversal de imunohistoquímica mostrando o colágeno III.....	47
<b>FIGURA 6</b> - Corte histológico transversal corado com Picrossirius-polarização mostrando a distribuição do colágeno total no endomísio .....	48
<b>FIGURA 7</b> - Corte histológico transversal corado com Resorcina fucsina da Weigert com oxidação prévia, mostrando a distribuição das fibras elásticas no endomísio .....	48
<b>FIGURA 8</b> - Corte histológico transversal de imunohistoquímica mostrando a MMP-1 .....	49
<b>FIGURA 9</b> - Corte histológico transversal de imunohistoquímica mostrando o versican.....	49
<b>FIGURA 10</b> -Corte histológico transversal de imunohistoquímica mostrando a fibronectina.....	50
<b>FIGURA 11</b> -Corte histológico corado com Picrossirius-polarização em menor aumento .....	50

## **LISTA DE TABELAS**

**TABELA 1** - Dados Clínicos e polissonográficos dos três grupos de pacientes..... 45

**TABELA 2** - Área proporcional da MEC do endomísio na parede lateral da faringe em controles, roncoadores primários e SAOS ..... 51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SAOS	síndrome da apnéia obstrutiva do sono
CPAP	<i>continuous positive airway pressure</i> (aparelho gerador de pressão positiva contínua na via aérea)
MEC	matriz extracelular
IAH	índice de apnéia – hipopnéia
MMP	metaloproteinases da matriz
IMC	índice de massa corpórea
UPFP	uvulopalatofaringoplastia
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
HC FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
BSA	albumina sérica
PBS	fosfato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	água oxigenada

## LISTA DE SÍMBOLOS

h	hora
%	percentual
<	menor do que
>	maior do que
Kg	kilograma
m <sup>2</sup>	metro quadrado
μm	micrômetro
μm <sup>2</sup>	micrômetro quadrado
v	volume
=	igual a
°	graus celsius

## RESUMO

Dantas DAS. *Avaliação do papel da matriz extracelular na musculatura da parede lateral da faringe na fisiopatologia da síndrome da apnéia obstrutiva do sono* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 71p.

A Parede lateral da faringe parece ser a estrutura central envolvida no colapso da faringe nos pacientes com síndrome da apnéia obstrutiva do sono (SAOS). Os pacientes com roncos e apnéia têm uma faringe mais colapsável associada a um espessamento da musculatura da parede lateral da faringe, em grande parte formada pelo músculo constritor superior da faringe. O endomísio da matriz extracelular do músculo esquelético tem uma íntima relação com as células musculares, influenciando suas propriedades mecânicas e biológicas, podendo modificar seu comportamento e função. As fibras colágenas e elásticas formam o arcabouço do tecido conectivo, enquanto os proteoglicanos e as glicoproteínas estruturais (fibronectina) têm importante papel na propriedade de adesão e hidratação dos tecidos e as metaloproteínas são responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular. Os fatores determinantes da complacência excessiva da musculatura da parede lateral são desconhecidos. É possível que a MEC tenha um papel relevante neste aspecto. O objetivo deste estudo é descrever e comparar a densidade dos componentes da matriz extracelular do endomísio da musculatura da parede lateral da faringe em controles, roncadores e apnéicos. Neste estudo prospectivo foram avaliados 61 pacientes maiores de 18 anos e não obesos do Departamento de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo, com indicação de cirurgias faríngeas no período de 2005 e 2006. Os pacientes foram divididos em três grupos: controles (14 pacientes sem roncos ou SAOS), 18 roncadores primários e 29 pacientes com SAOS. Os espécimes foram obtidos da musculatura da parede lateral da faringe (constritor superior da faringe) durante cirurgias faríngeas. Por meio de análise histoquímica e imunohistoquímica foi determinada a área proporcional do colágeno total, fibras elásticas, colágeno tipos I e III, metaloproteínas 1 e 2, versican e fibronectina, no endomísio destas amostras e comparada entre os grupos. Os resultados foram ainda correlacionados com dados antropométricos. O colágeno tipo I foi o componente mais abundante da matriz extracelular no constritor superior da faringe. Observamos uma correlação positiva entre o colágeno I e a idade ( $r=0,42$ ,  $p=0,01$ ) e inversa com o colágeno III ( $r=-0,28$ ,  $p=0,027$ ). O índice de massa corpórea também mostrou uma correlação inversa com o colágeno III ( $r=-0,311$ ,  $p=0,017$ ). Não houve diferenças estatisticamente significantes para os componentes da MEC entre os grupos. Em resumo, a análise histológica da musculatura da parede lateral da faringe de um largo grupo de pacientes com distúrbios do sono, revelaram que a composição da matriz extracelular é relacionada à idade e o peso, e não pode ser envolvida nos mecanismos que levam a colapsibilidade e espessamento da parede lateral da faringe.

Descritores: 1.Apnéia do sono tipo obstrutiva 2.Matriz extracelular 3.Faringe 4.Músculo esquelético 5.Orofaringe

## SUMMARY

Dantas DAS. *Extracellular matrix of the lateral pharyngeal wall in obstructive sleep apnea syndrome* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 71p.

The lateral muscular pharyngeal wall appears to be the predominant structure involved in the collapse of the pharynx in obstructive sleep apnea (OSA). OSA patients and snorers have a narrower pharynx which is more susceptible to collapse and is associated with muscle thickening in the lateral pharyngeal wall, largely formed by superior pharyngeal constrictor. The endomysial extracellular matrix of skeletal muscle has an intimate relationship with the muscle cells and has an important influence on its mechanical and biological properties and can modify their behavior and function. Collagen and elastic fibers form the scaffolding of the connective tissue and proteoglycans and structural glycoproteins (fibronectin) have important roles in hydration, resiliency and adhesive properties of the tissues and the matrix metalloproteinases are involved in extracellular matrix components degradation. The determining factors in the compliance of lateral muscular pharyngeal wall are also unknown. It is possible that the ECM has a relevant role in this aspect. Our objective was to determine and compare the density of the components of the extracellular matrix in the deep, structural lateral pharyngeal muscular walls in snorers, OSA and control patients and correlate with age and weight. In this prospective study we evaluated 61 patients older than 18 and non-obese with indications for pharyngeal surgery at the department of Otolaryngology of the Hospital das Clínicas of the São Paulo University, between 2005 and 2006. The patients were divided in three groups: controls (14 patients), 18 primary snorers and 29 OSA patients. We obtained specimens from the lateral pharyngeal muscular wall (superior constrictor muscle) during pharyngeal surgeries. Using histochemical and immunohistochemical analyses, we determined the fractional area of total collagen, elastic fibers, collagen I and III, matrix metalloproteinase 1 and 2, versican and fibronectin in the endomysium of these samples, and compared among groups. Results were further correlated with anthropometric data. Collagen type I was the most abundant component of the ECM within the pharyngeal muscle. There was a positive correlation between collagen I and age ( $r=0.419$ ,  $p=0.01$ ) and an inverse one with type III collagen ( $r=-0.284$ ,  $p=0.027$ ). Body mass index inversely correlated with collagen type III ( $r=-0,311$ ,  $p=0,017$ ). There were no statistically significant differences for any of the components of the ECM among groups. In summary, histological analysis of the lateral muscular pharyngeal wall of a large group of patients with sleep disturbances revealed that its extracellular matrix composition is age and weight related but may not be involved in the mechanisms leading to the collapsibility of the lateral wall of the pharynx.

Descriptors: 1.Obstructive sleep apnea 2.Extracellular matrix 3.pharynx 4.Skeletal muscle 5.Oropharynx

## **ARTIGO CIENTÍFICO**

### **EXTRACELLULAR MATRIX OF THE LATERAL PHARYNGEAL WALL IN OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA SYNDROME**

Danielle A. S. Dantas <sup>1</sup>; Thais Mauad <sup>2</sup>; Luiz F.F. Silva <sup>2</sup>; Geraldo Lorenzi-Filho <sup>3</sup>;  
Gilberto G. S. Formigoni <sup>1</sup>; Michel B. Cahali <sup>1</sup>.

(1) Department of Otolaryngology; (2) Laboratory of Medical Investigation 5, Department of Pathology; (3) Sleep Laboratory, Pulmonary Division, Heart Institute all from the Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Corresponding author:

Danielle Andrade da Silva Dantas, MD

Av. Ibijaú, 331 / 71

04524-020

São Paulo SP

Brazil

Tel: 0055 11 83266992

Fax: 0055 11 50550312

E-mail: andradeds@globo.com

Supported by: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant# 06/50630-7), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

This article has an online data supplement, which is accessible from this issue's table of contents at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org).

Running title: Extracellular matrix in lateral pharyngeal wall



## **ABSTRACT**

**Rationale:** Excessive compliance of the lateral pharyngeal wall plays a key role in the genesis of obstructive sleep apnea syndrome (OSAS). Increasing age, weight and severity of OSAS are directly associated with pharyngeal compliance. The endomysial extracellular matrix (ECM) of skeletal muscle can modify muscle cell behavior and function. We hypothesized that ECM components of the lateral pharyngeal wall may contribute to upper airway obstruction.

**Objective:** To quantify the components of the ECM in the lateral pharyngeal muscular wall and correlate with anthropometric and sleep parameters.

**Methods:** Specimens from the superior pharyngeal constrictor muscle were obtained during pharyngeal surgeries (tonsillectomy or palatopharyngoplasty) of 61 non-obese adult patients divided in 14 controls, 18 snorers and 29 OSAS patients determined by full polysomnography. The fractional area of elastic fibers, collagen I and III, matrix, versican, fibronectin and metalloproteinase 1 and 2 in the endomysium were determined by histochemical and immunohistochemical analyses.

**Measurements and main results:** Age correlated positively with collagen type I ( $r=0.419$ ,  $p=0.01$ ) and negatively with collagen type III ( $r=-0.284$ ,  $p=0.027$ ). Body mass index correlated inversely with collagen type III ( $r=-0.311$ ,  $p=0.017$ ). However, ECM components did not correlate with OSAS.

**Conclusion:** Collagen at the lateral pharyngeal muscular wall is age and weight related. However, progressive collapse of this region during sleep in OSAS cannot be explained by changes in density of the components of the ECM.

**Word count:** 225

**Key words:** extracellular matrix, obstructive sleep apnea, lateral pharyngeal muscular wall

## INTRODUCTION

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is characterized by periodic upper airway occlusion during sleep associated with excessive daytime sleepiness<sup>1</sup>. OSAS is recognized as a major public health problem due to its high prevalence (2-4%) and health burden. The prevalence of OSAS increases with increasing aging and body mass index<sup>2</sup>. There is a progressive path from normal nocturnal breathing towards habitual snoring and OSAS that is related to a progressive upper airway obstruction<sup>3</sup>. However, the mechanisms involved in the genesis of upper airway obstruction are not completely understood.

There is mounting evidence that the lateral pharyngeal muscular wall plays a major role in the genesis of the collapse of the pharynx in patients with OSAS. OSAS patients have a narrower pharynx in the lateral dimension which is more susceptible to collapse. The increased compliance of the lateral pharyngeal wall of patients with OSAS is associated with muscle thickening<sup>3</sup>. The collapse of the lateral wall appears as the initial site of collapse observed by endoscopies in patients with OSAS while asleep<sup>4</sup>. Moreover, surgeries that act on the musculature of the lateral wall, such as lateral pharyngoplasty<sup>5</sup> maxillomandibular advancement<sup>6</sup> are more effective in reducing OSAS severity than surgeries that consist of excising and reconstructing the tissues of the pharyngeal surface such as uvulopalatopharyngoplasty<sup>7,8</sup>. This suggests that the structure of the musculature of the lateral wall, primarily within the superior pharyngeal constrictor, has an important role in the genesis of OSAS. The superior pharyngeal constrictor is a deep-seated skeletal muscle that forms the superior part of the lateral and posterior pharyngeal airway. This muscle has an important activity not only during the

pharyngeal closure phase of swallowing, but it is also activated during upper airway reopening, in the end of apnea. This indicates that the superior pharyngeal constrictor activation is similar to that of pharyngeal dilator muscles during apnea<sup>9</sup>.

The observation that patients with OSAS under total paralysis present upper airway obstruction<sup>10</sup>, suggest that OSAS is, at least in part, independent of neurological or muscular activity. The expected decrease in muscle tone during sleep does not sufficiently explain upper airway obstruction and the structural components of the pharyngeal tube, particularly of the lateral muscular plays an important role in the pathogenesis of OSAS. However, the factors determining the compliance of a skeletal muscle in the absence of tonus are unknown.

The composition of the extracellular matrix (ECM) of a given tissue has an important influence on its mechanical and biological properties. The most important biological role of the ECM is in the integration between cells and tissues, including cell morphogenesis, development and regulation of cell proliferation. In addition, the ECM also provides mechanical support, resistance and elasticity to tissues<sup>11,12,13</sup>. Collagen and elastic fibers form the scaffolding of the connective tissue and proteoglycans and structural glycoproteins (fibronectin) have important roles in hydration, resiliency and adhesive properties of the tissues<sup>14,15,16</sup>. The ECM of skeletal muscle, such as the superior pharyngeal constrictor, is organized in levels, with the endomysial ECM having the most intimate contact with the muscle cells<sup>13,17</sup>. The matrix metalloproteinases (MMPs) are involved in ECM degradation in several tissues, including the skeletal muscles<sup>12,14</sup>. Modifications of the ECM composition or of its regulators, either by external or genetic factors, may lead to the onset of pathological processes<sup>14</sup>.

In this study we hypothesized that alterations in the densities of specific ECM elements could be associated with the progressive collapsibility of the lateral pharyngeal wall found in upper airway obstruction. To this end we determined and compared the proportional area of collagen fibers, elastic fibers, proteoglycans (versican), fibronectin and metalloproteinases 1 and 2 (MMP-1 and MMP-2) in the endomysium of the musculature of the lateral pharyngeal wall in controls, primary snorers and patients with OSAS. We further aimed to determine whether ECM composition in the pharyngeal muscular wall could be related to age or weight.

## **METHODS**

We evaluated 61 patients submitted to palatine tonsillectomy because of chronic caseous or repeated acute tonsillitis (control group) or palatopharyngoplasty plus palatine tonsillectomy because of snoring or OSAS at the department of Otolaryngology of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, between 2005 and 2006. Patients younger than 18 years old and obese patients (body mass index (BMI) > 30 kg/m<sup>2</sup>) were excluded.

This study was approved by the Ethics Committee of our institution and signed informed consent was obtained from all patients enrolled in the study. All patients were submitted to standard clinical evaluation, including assessment of subjective daytime sleepiness evaluated by Epworth sleepiness scale, and scores > 10 were considered excessive daytime sleepiness.

Patients were divided according to clinical characteristics and full polysomnography findings that was performed within one month before surgery in three groups: controls, primary snorers and OSAS patients. The controls (14 patients)

had no history of snoring with an apnea-hypopnea index (AHI) < 5events/hour. Patients with AHI < 10events/hour with a history of loud snoring and no daytime somnolence (Epworth<10) were considered primary snorers (18 patients) OSAS (29 patients) was considered present when AHI > 5events/hour plus excessive daytime somnolence (Epworth >10). The OSAS group was further stratified into three subgroups: mild ( $5 < \text{AHI} \leq 15$ /hour, 8 patients), moderate ( $15 < \text{AHI} \leq 30$ /hour, 12 patients) and severe OSAS ( $\text{AHI} > 30$  /hour, 9 patients).

### **Tissue preparation**

The tonsils were fixed in 10% formaldehyde and paraffin-embedded. The paraffin blocks were cut into 4  $\mu\text{m}$ -thick slices and stained with hematoxylin and eosin to evaluate the adequacy of the specimen for the study. See online data supplement for details.

We analyzed the ECM within the muscular fibers adhered to the tonsils, which is predominantly within the superior pharyngeal constrictor muscle.

### **Histochemical analysis**

For identification of elastic fibers, Weigert's Resorcin-Fuchsin technique with oxidation was used as previously described<sup>18</sup>.

### **Immunohistochemical analysis**

Collagen type I, collagen type III, versican, fibronectin, MMP-1 and MMP-2 were characterized by immunohistochemical reactions. All sections were stained during the same staining session using antibodies coming from the same batch. For negative controls, the primary antibody was replaced by phosphate buffer solution (PBS) during the staining process. Further information about the immunohistochemistry can be found in the online data supplement.

### **Morphometric analysis**

The density of the different components of the ECM present in the endomysium of the lateral pharyngeal wall were quantified through image analysis, using the Image-Pro® Plus 4.1 for Windows® (Media Cybernetics-Silver Spring, MD, USA) software connected to a digital camera (JVC TK-C1380 Color Video Camera, Victor Company of Japan Limited, Japan) and to an optical microscope (Leica DMR, Leica Microsystems, Wetzlar GmbH, Germany). The specimens were analyzed at 400x magnification.

The measurements were made by an examiner blinded to the study groups. The data were used to calculate the mean value of the analysis of 15 fields for each marker per patient. The values were expressed as percentages (%) of the fractional positive area of each element of the ECM in relation to the total area of muscle in the analyzed area.

### **Statistical Analysis**

Data are expressed as medians and interquartile ranges. Statistical analysis was performed with the SPSS software version 15.0 (SPSS Inc.®, Chicago, IL, USA). The distribution of the study variables was non-parametric, according to the Kolmogorov-Smirnov normality. For comparisons between groups, the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used. To correlate the clinical variables with the ECM components, the Spearman's correlation test was used. The level of significance was set at 5% ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS

The clinical and polysomnographic characteristics of the patients are shown in Table 1. The OSAS group was significantly older than the control group ( $p = 0.02$ ) and their BMI was higher than those in the control group ( $p = 0.001$ ) and in the snorers group ( $p = 0.001$ ). There was no statistically significant difference regarding age and BMI among the OSAS subgroups.

H&E staining showed that the skeletal muscle bundles of the superior pharyngeal constrictor were localized adjacent to the tonsillar tissue, separated by a rim of connective tissue of variable thickness and small vessels. We only analyzed the fragments that contained enough musculature for histological analysis (15 fields at 400x) and absence of artifacts, such as bleeding and cauterization effects. Tonsillar tissue presented hyperplastic follicles, in most of the cases, and there was no suppurative inflammation. No signs of inflammatory cell infiltration within the muscle tissue were observed in any of the cases analyzed (Figure 1). All the components of the ECM were sparsely present within the endomysium. Collagen was the most abundant component, specifically collagen type I (Figure 2A, 2B). Histochemical analysis revealed that the elastic fibers were organized in slender fibers within muscle cells individually and existed as small bridges that interconnected the cells and connected them to the ECM (Figure 2C). Versican (Figure 2D) and fibronectin (Figure 2E) were the sparsest components in the ECM of the endomysium of the superior pharyngeal constrictor, present in thin, continuous pericellular distributions. MMP-1 expression in muscle cells was variable and irregular, both in the same muscle fiber (Figure 2F) and between cases. The presence of MMP-2 was not observed in the skeletal muscle in any of the cases and no further quantification was performed.

Histochemistry and immunohistochemistry data on the proportional area of each component of the ECM are depicted in table 2. There were no significant differences among the three groups (Table 2). Similar results were obtained when the analysis was repeated for the OSAS subgroups (data not shown).

There were no significant correlations between the fractional area of the ECM proteins with gender and polysomnographic data (AHI, minimum oxyhemoglobin saturation). In contrast, age correlated significantly with the amount of collagen type I ( $r = 0.419$ ,  $p = 0.01$ ) and inversely with collagen type III ( $r = -0.284$ ,  $p = 0.027$ ). The BMI inversely correlated with collagen type III ( $r = -0.311$ ,  $p = 0.017$ ) (Figure 3).

## **DISCUSSION**

In the present study, we have analyzed the composition of ECM and regulators in the endomysial region of the superior pharyngeal constrictor muscle in controls, simple snorers and patients with OSAS. ECM composition of the muscle walls may have an important role in determining cell activity and function<sup>11</sup>. To the best of our knowledge, this is the first study describing ECM composition in the pharyngeal musculature. The ECM collagen composition was related to patient's age and BMI. No differences were observed among the three study groups for any of the components quantified, suggesting that the density of the endomysial ECM is not responsible for the progressive compliance of the lateral pharyngeal wall in snorers and OSAS patients.

In this study, we have shown that collagen type I is the most abundant component of the ECM in the superior pharyngeal constrictor (6.33%) This is in agreement with other studies of skeletal muscle in humans, where collagen type I



represented the majority of all types of collagen<sup>19</sup>. We further observed a significant, positive correlation between age and collagen type I and a negative correlation between age and collagen type III. Our results are similar to previous studies on age-related changes of the cardiac skeletal muscle. Previous studies have shown an increased concentration of collagen type I<sup>20</sup> and a decrease in collagen type III<sup>21</sup> associated with increasing age. Such changes might have functional consequences, leading to an increase in stiffness, by causing an impaired contractility of the muscle.

In our study we excluded obese patients in order to exclude the well known fact that obesity is an independent risk factor for OSAS<sup>2</sup>. Despite that, we found in this study an inverse correlation between BMI and collagen type III ( $r = -0.311$ ,  $p = 0.017$ ), similar to what occurs with age. There are reports that obesity modifies the turnover of collagen in cardiac skeletal muscle and might alter the muscle functionality<sup>22</sup>.

Elastic fibers are important components on tissues that contain elastometric properties<sup>23</sup>, conferring long range deformability and passive recoil without energy input<sup>24</sup>. One qualitative study reported disorganization of elastic fibers around the musculus uvulae in patients with OSAS. This alteration was less evident than in the uvula mucosa and did not have significant, functional correlations<sup>25</sup>. In our study, we detected a low content of elastic fibers in the superior pharyngeal constrictor endomysium and did not detect any differences among groups, age or BMI-related changes. It is possible that this finding reflects the anatomical configuration and functionality of that muscle, where no important stretching occurs during swallowing.

Fibronectin and versican were present in small proportions in the endomysium of the superior pharyngeal constrictor of all studied groups. MMP-1 in superior pharyngeal constrictor muscle cells had a variable expression among cases and among

muscular fibers and did not differ between groups. Changing amounts of these proteins in the skeletal muscles seem to be related to pathological conditions such as the inflammatory and dystrophic myopathies and muscle denervation<sup>26,27,28,29,30</sup>.

Some histological alterations have been previously identified in patients with OSAS and in snorers, including inflammation of the mucosa and surface pharyngeal muscles<sup>25,31,32,33,34</sup> and signs of neurogenic lesions in the oropharynx musculature<sup>32,35</sup>. Although mucosal inflammation in the oropharynx has been observed in patients with OSAS, we did not detect any significant inflammatory cells at the superior pharyngeal constrictor level. Boyd and colleagues<sup>32</sup> saw an increase in inflammatory cells in the mucosal and muscle cells of the soft palate and of the tonsillar pillars. In that case, inflammation in the muscle cells was only one-fifth of the amount of inflammation within the mucosa. Muscles with inflammatory characteristics in OSAS have been detected by other authors<sup>25,31,32,33,34</sup> and were more superficial in the oropharynx, within the uvula, soft palate and tonsillar pillars. We believe that the lack of inflammation in superior pharyngeal constrictor, a deep located muscle in the pharynx, corroborates the idea of an inflammatory role of habitual snoring that affects the lining tissues of the upper airway predominantly, with minor consequences to the deeper layers.

Motor denervation of the musculature of the soft palate and/or tonsillar pillars has been proposed to be involved in the pathogenesis of OSAS<sup>25,35</sup>. Rats submitted to skeletal muscle denervation showed an accumulation of collagen type I and type III<sup>36,37</sup>, fibronectin<sup>29</sup> and proteoglycans<sup>30</sup> within muscular fibers. We suggest that in snorers and in OSAS patients, denervation changes, if present, may not lead to extensive ECM changes at the muscular level.

It is unlikely that our results were affected by methodological errors. To our knowledge, this is the largest study including ECM quantitative analyses of pharyngeal muscles in groups of well characterized controls, snorers and OSAS patients. We have used image analysis to determine the components of the ECM and MMP in histological sections, avoiding the subjectivity of a semi-quantitative analysis. We have analyzed muscle fibers adhered to the deep, inner surface of surgically removed palatine tonsils<sup>38,39</sup>. The superior pharyngeal constrictor muscle is the major component of the tonsillar fossa<sup>40</sup>. To a lesser extent, part of the palatopharyngeus muscle may have been present in a few samples, as it may form part of the tonsillar fossa in some individuals<sup>40</sup>, although the surgical technique we used took care to preserve this muscle.

Some patients included in the control group presented with repeated tonsillitis, but we were careful to exclude patients with a past history of phlegmon or peritonsillar abscess, preventing inflammatory involvement of the deep musculature of the lateral wall of the pharynx. Indeed, no muscular inflammatory infiltration was observed in the controls. We have not examined other muscular compartments such as the perimysium and epimysium of the superior pharyngeal constrictor. We believe that the endomysium, having the most intimate contact, has more influence on the functional and biological properties of muscle cells.

What are the clinical implications of our findings? Surgical procedures such as the uvulopalatopharyngoplasty aim not only to increase the airway spaces but also to produce fibrosis, with variable results<sup>7</sup>. The lack of difference in the ECM components among controls, snorers and OSAS patients suggests that increasing fibrosis at the muscular level may not be relevant in the treatment of such diseases.

We believe that a structural alteration in the musculature of the lateral wall of the pharynx has a key role in the genesis of apnea. Our findings suggest that muscle ECM is not the predominant mechanism of such structural alteration. Schwab and colleagues found hereditary characteristics in the thickening of the lateral wall of patients with OSAS<sup>41</sup>. It is possible that OSAS pathogenesis involves a genetic trait that affects muscle proteins related to contractility<sup>41</sup>. Although we have not detected quantitative alterations in elastic fibers, we cannot exclude the possibility that alterations at the ultrastructural level occur in OSAS. Sullivan and colleagues detected a high prevalence of OSAS in patients with Marfan syndrome, a genetic disease causing marked muscle flaccidity and increased collapsibility of pharyngeal muscles due to abnormal elastic fibers<sup>42,43</sup>.

In summary, histological analysis of the lateral muscular pharyngeal wall of a large group of patients with sleep disturbances revealed that its ECM composition is age and weight related but may not be involved in the mechanisms leading to the collapsibility of the lateral wall of the pharynx. Further studies describing the composition of skeletal muscle proteins could be useful in understanding the excessive muscle compliance observed in OSAS patients.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank Ângela Santos and Maria Cristina Medeiros for preparing the immunohistochemical reactions on tissue sections.

## REFERENCES

1. Remmers JE, De Groot WJ, Sauerland EK, Anch AM. Pathogenesis of upper airway occlusion during sleep. *J Appl Physiol* 1978;44:931-8.
2. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 1993;328:1230-5.
3. Schwab RJ, Gupta KB, Gefter WB, Metzger LJ, Hoffman EA, Pack AI. Upper airway and soft tissue anatomy in normal subjects and patients with sleep-disordered breathing: significance of the lateral pharyngeal walls. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;125:1673-89.
4. Guilleminault C, Hill MW, Simmons FB, Dement WC. Obstructive sleep apnea: electromyographic and fiberoptic studies. *Exp Neurol* 1978;62:48-67.
5. Cahali MB. Lateral pharyngoplasty: a new treatment for obstructive sleep apnea hypopnea syndrome. *Laryngoscope* 2003; 113:1961-68.
6. Li KK, Guilleminault C, Riley RW, Powell NB. Obstructive sleep apnea and maxillomandibular advancement: an assessment of airway changes using radiographic and nasopharyngoscopic examinations. *J Oral Maxillofac Surg* 2002;60:526-30.
7. American Sleep Disorders Association. Practice parameters for the treatment of obstructive sleep apnea in adults: the efficacy of surgical modifications of the upper airway. *Sleep* 1996;19:152-5.

8. Cahali MB, Formigoni GGS, Gebrim EMMS, Miziara ID. Lateral pharyngoplasty versus uvulopalatopharyngoplasty: a clinical, polysomnographic and computed tomography measurement comparison. *Sleep* 2004; 27:942-50.
9. Kuna ST, Smickley JS. Superior faringeal constrictor activation in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:874-80.
10. Isono S, Remmers JE, Tanaka A, Sho Y, Sato J, Nishino T. Anatomy of pharynx in patients with obstructive sleep apnea and in normal subjects. *J Appl Physiol* 1997; 82:1319-26.
11. Labat-Robert J, Robert L. Aging of the extracellular matrix and its pathology. *Exp Gerontol* 1988;3:5-18.
12. Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteinases and lung injury. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:1109-15.
13. Kovanen V. Intramuscular extracellular matrix: complex environment of muscle cells. *Exerc Sport Sci Rev* 2002;30:20-5.
14. Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. Extracellular matrix. *FEBS Lett* 1990; 268:386-93.
15. Yanagishita M. Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn* 1993;43:283-93.
16. Mosher DF, Furcht LT. Fibronectin: review of its structure and possible functions. *J Invest Dermatol* 1981;77:175-80.
17. Järvinen TAH, Józsa L, Kannus P, Järvinen TL, Järvinen M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscle. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. *J Muscle Res Cell Motil* 2002;23:245-54.

18. Montes GS. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int* 1996;20:15-27.
19. kurosu H. Biochemical studies on collagen and connectin from human skeletal muscle: age-related changes in the properties of elasticity. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1979;53:1641-52.
20. Souza RR. Aging of myocardial collagen. *Biogerontology* 2002;3:325-35.
21. Mays PK, Bishop JE, Laurent GJ. Age relatd changes in the proportion of types I and III collagen. *Mech Ageing Dev* 1988;45:203-12.
22. Quilliot D, Alla F, Böhme P, Bruntz JF, Hammadi M, Dousset B, Ziegler O, Zannad F Myocardial collagen turnover in normotensive obese patients: relation to insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29:1321-8.
23. Ross R. The elastic fiber: a review. *J Histochem Cytochem* 1973;21:199-208.
24. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci* 2002;115:2817-28.
25. Sériès F, Chakir J, Boivin D. Influence of weight and sleep apnea status on the immunological and structural features of the uvula. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:1114-9.
26. Kieseier BC, Schneider C, Clements JM, Gearing AJ, Gold R, Toyka KV, Hartung HP Expression of specific matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies. *Brain* 2001;124:341-51.
27. Zanotti S, Saredi S, Ruggieri A, Fabbri M, Blasevich F, Romaggi S, Morandi L, Mora M. Altered extracellular matrix transcript expression and protein modulation in primary Duchenne muscular dystrophy myotubes. *Matrix Biol* 2007;26:615-24.

28. Foidart M, Foidart JM, Engel WK. Collagen localization in normal and fibrotic human skeletal muscle. *Arch Neurol* 1981;38:152-7.
29. Salonen V, Lehto M, Kalimo H, Penttinen R, Aro H. Changes in intramuscular collagen and fibronectin in denervation atrophy. *Muscle nerve* 1985;8:125-31.
30. Fadic R, Brandan E, Inestrosa NC. Motor nerve regulates muscle extracellular matrix proteoglycan expression. *J Neurosci* 1990;10:3516-23.
31. Woodson BT, Garancis JC, Toohill RJ. Histopathologic changes in snoring and obstructive sleep apnea syndrome. *Laryngoscope* 1991;101:1318-22.
32. Boyd JH, Petrof BJ, Hamid Q, Fraser R, Kimoff RJ. Upper airway muscle inflammation and denervation changes in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:541-6.
33. Paulsen FP, Steven P, Tsokos M, Jungmann K, Müller A, Verse T, Pirsig W. Upper airway epithelial structural changes in obstructive sleep-disordered breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:501-9.
34. Sekosan M, Zakkar M, Wenig BL, Olopade CO, Rubinstein I. Inflammation in the uvula mucosa of patients with obstructive sleep apnea. *Laryngoscope* 1996;106:1018-20.
35. Friberg D, Ansved T, Borg K, Carlsson-Norlander B, Larsson H, Svanborg E. Histological indications of a progressive snorers disease in an upper airway muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:586-93.
36. Sawai H. Collagen metabolism of skeletal muscles following injuries of the peripheral nerves. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1982;56:753-64.
37. Tsuji M. Alterations in collagen synthesis after transection of peripheral nerves. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1989;63:860-70.



38. Erkiliç S, Aydın A, Koçer NE. Histological features in routine tonsillectomy specimens: the presence and the proportion of mesenchymal tissues and seromucinous glands. *J Laryngol Otol* 2002;116:911-3.
39. Gnepp DR, Souther J. Skeletal muscle in routine tonsillectomy specimens: a common finding. *Hum Pathol* 2000;31:813-6.
40. Ohtsuka K, Tomita H, Murakami G. Anatomy of the tonsillar bed: topographical relationship between the palatine tonsil and the lingual branch of the glossopharyngeal nerve. *Acta Otolaryngol* 2002;Suppl.546:99-109.
41. Schwab RJ, Pasirstein M, Kaplan L, Pierson R, Mackley A, Hachadoorian R, Arens R, Maislin G, Pack AI. Family aggregation of upper airway soft tissue structures in normal subjects and patients with sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:453-63.
42. Cistulli PA, Sullivan CE. Sleep-disordered breathing in Marfan's syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:645-8.
43. Cistulli PA, Sullivan CE. Sleep apnea in Marfan's syndrome. Increased upper airway collapsibility during sleep. *Chest* 1995;108:631-5.

## LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1. Hematoxylin and eosin section. Skeletal muscle bundles of the superior pharyngeal constrictor was localized adjacent to the tonsillar tissue, separated by a rim of connective tissue of variable thickness and small vessels. Observe the absence of inflammatory infiltration. t= tonsil, c= connective tissue, v= vessel, spc= superior pharyngeal constrictor muscle. Scale bar= 200 $\mu$ m

Figure 2. Transverse histologic sections of endomysial ECM components in the SPC muscle. (2A) Representative immunohistochemical section of type I collagen (brown coloration). (2B) Immunohistochemical section of type III collagen (brown coloration). (2C) Oxidized Weigert resorcin-fuchsin staining shows endomysial distribution of elastic fibers (slender fibers within muscle cells individually and small bridges that interconnect the cells and connected them to the ECM) b= bridges (2D) Immunohistochemical section of MMP-1. Note the variability of MMP-1 expression in muscle cells, both in the same muscle fiber and between cases. (2E) Immunohistochemical section of versican. (2F) Immunohistochemical section of fibronectin. Observe that these two last were the sparsest components of the ECM in the endomysium. Scale bar = 50 $\mu$ m

Figure 3. Correlation between patient age and collagen type I and type III and BMI and collagen type III. There was a significant, positive correlation between age and the amount of collagen type I, and an inverse correlation between age and collagen type III, and an inverse correlation between BMI and collagen type III.

## TABLES

**Table 1.** Anthropometric and polysomnographic data of the patients studied Data are expressed as median and interquartile range.

	CONTROL N = 14	SNORERS N = 18	OSAS N = 29
Male/Female	7/7	10/8	19/10
Age, years	26 (13)	34 (25)	40 (16)*
BMI, Kg/m <sup>2</sup>	23.1 (5)	24.5 (3)	28.0 (4) †
AHI, events/hour	0.8 (2.3)	4.9 (6.4)	18.5 (18.2) ‡
Minimum SaO <sub>2</sub> , %	89 (5)	88 (8)	82 (12) §

BMI = body mass index; AHI = Apnea–hypopnea index, Minimum SaO<sub>2</sub> = minimum oxyhemoglobin saturation.

\* p = 0.02 in relation to controls, † p = 0.001 in relation to controls and snorers, ‡ p = 0,0001 in relation to controls and snorers, § p = 0.018 in relation to snorers and controls.

**Table 2.** Fractional area of the endomysial ECM of the lateral pharyngeal wall in controls, primary snorers and OSA patients. Data are presented as median and interquartile range.

ECM components	Fractional area (%)			
	Controls	Snorers	OSAS	p
Elastic fibers	0.68 (0.01)	0.47 (0.00)	0.69 (0.01)	0.319
Type I collagen	6.33 (0.05)	7.83 (0.03)	7.90 (0.03)	0.331
Type III collagen	3.98 (0.04)	3.69 (0.03)	3.67 (0.03)	0.451
MMP – 1	6.18 (0.08)	4.76 (0.07)	3.69 (0.07)	0.778
Versican	0.32 (0.01)	0.18 (0.00)	0.21 (0.01)	0.104
Fibronectin	0.60 (0.01)	0.75 (0.01)	0.72 (0.01)	0.573

ECM = extracellular matrix, MMP-1 = matrix metalloproteinase 1, level of significance  $p < 0,05$

## FIGURES

Figure 1.

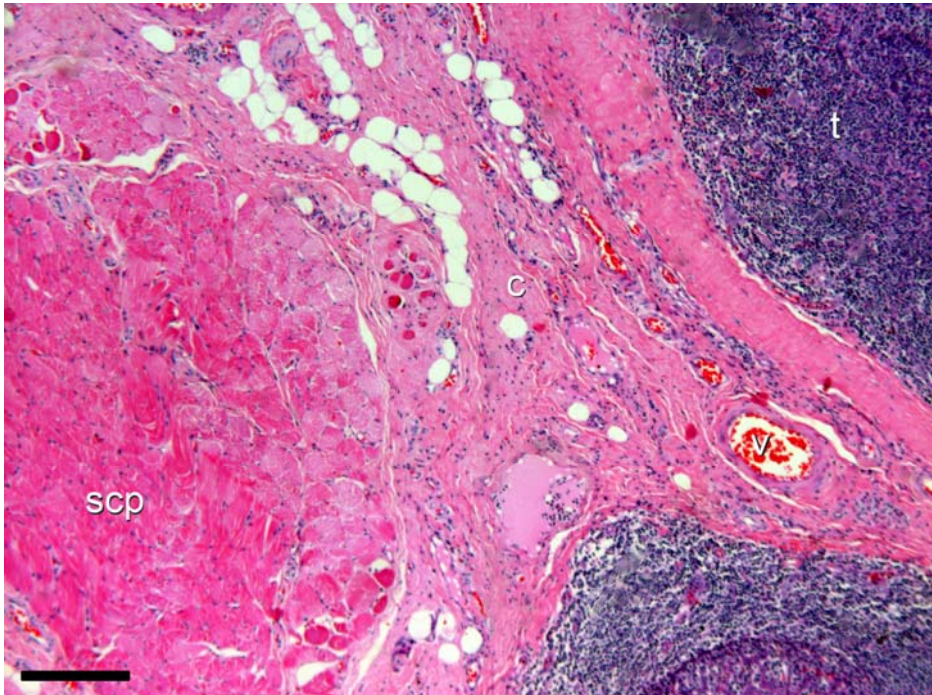


Figure 2.

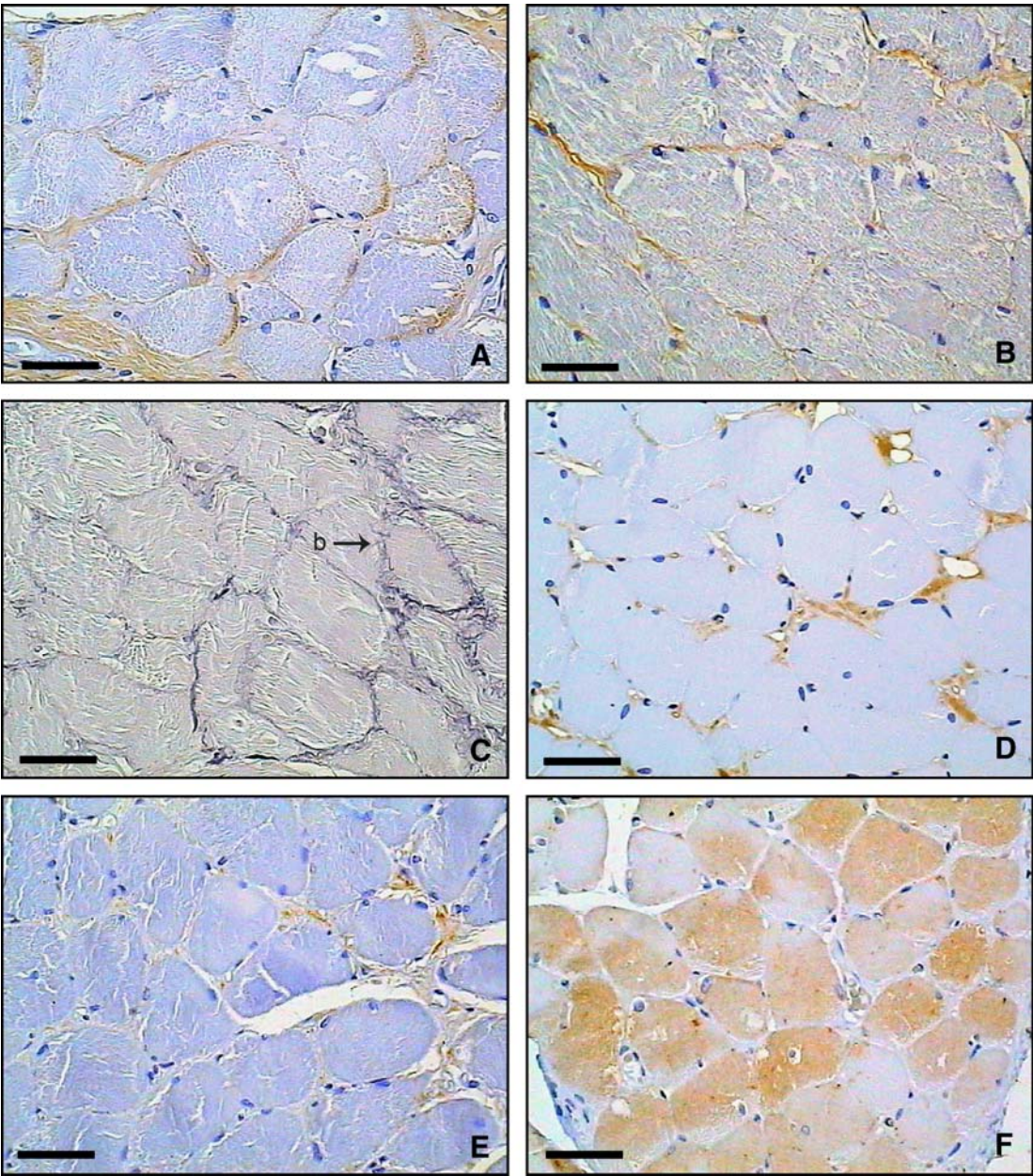
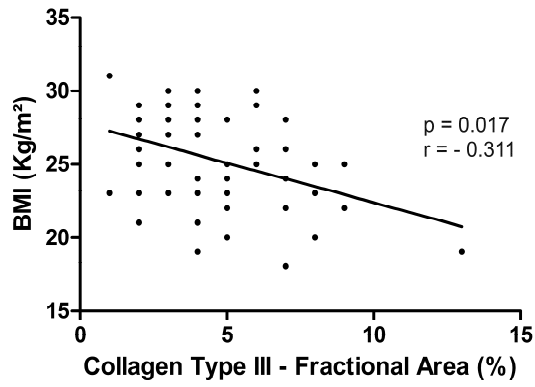
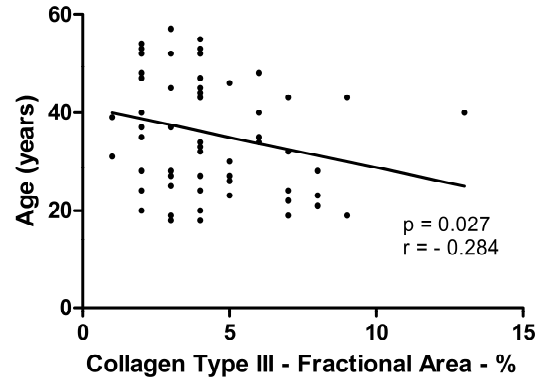
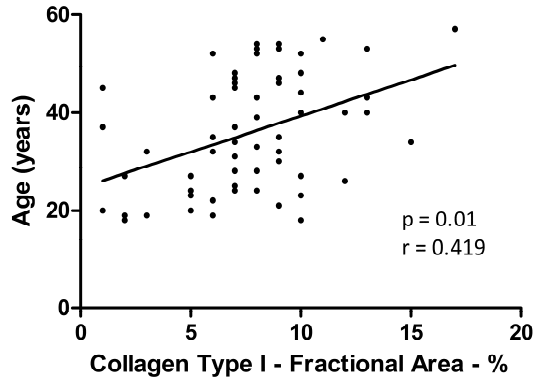


Figure 3.



# **1 INTRODUÇÃO**

---



A síndrome da apnéia obstrutiva do sono (SAOS) é reconhecida como um importante problema de saúde pública devido a sua alta prevalência (2-4%) e custo aos órgãos de saúde. A prevalência de SAOS aumenta com o aumento da idade e do índice de massa corpórea (IMC) (Young et al., 1993).

A parede lateral da faringe parece ser a estrutura crucial envolvida no colapso da SAOS. Os pacientes com SAOS têm uma faringe mais estreita e passivamente mais colapsante, independente da atividade neurológica ou muscular, observada nos pacientes submetidos à anestesia geral, com paralisia total da musculatura (Isono et al., 1997). Esta flacidez está presente na parede lateral da faringe e é associada ao espessamento da musculatura desta região (Schwab et al., 1995, Trudo et al., 1988). Ademais, em endoscopias realizadas durante o sono o colapso da parede lateral é o evento iniciador do colapso durante os episódios de apnéia, precedendo os movimentos de posteriorização da língua (Guilleminault et al., 1978). Acreditamos que a patogênese do colapso seria decorrente não da diminuição da atividade da musculatura ou falha do mecanismo de compensação neuromuscular, mas sim devido à flacidez estrutural do tubo faríngeo, especialmente a musculatura da parede lateral.

Outras importantes evidências do papel da parede lateral na SAOS são o mecanismo de ação do CPAP (*continuous positive airway pressure*) nasal, o qual com o aumento da pressão amplia a faringe lateralmente, reduzindo a espessura da parede lateral (Schwab et al., 1996) e também a cirurgia de avanço maxilomandibular

que melhora a estabilidade da parede lateral, podendo explicar as elevadas taxas de sucesso associadas a este tratamento (Li et al., 2002).

As cirurgias que consistem em exérese e reconstrução dos tecidos da superfície da faringe, como a uvulopalatofaringoplastia tem maus resultados (American Sleep Disorders Association, 1996), em oposição às cirurgias que atuam na musculatura profunda da parede lateral, como o avanço maxilomandibular e a faringoplastia lateral (Li et al., 2002; Cahali, 2003; Cahali et al., 2004). Isto sugere que a estrutura da musculatura profunda da parede lateral, constituída majoritariamente pelo constritor superior da faringe (CSF), tem uma implicação relevante na gênese da SAOS.

O CSF é um músculo esquelético que forma a porção superior das paredes lateral e posterior da faringe (Hollinshead, 1994) e tem uma importante atividade durante o fechamento da faringe na deglutição. Contudo, foi detectada uma ativação eletromiográfica do CSF durante a reabertura da faringe, no final da apnéia, indicando que sua ativação é semelhante ao comportamento dos dilatadores faríngeos. (Kuna, Smickley, 1997).

Estudos da matriz extracelular (MEC) nos tecidos têm se tornado frequentes na literatura nas últimas décadas, haja vista sua influência nas propriedades funcionais e mecânicas dos tecido, como por exemplo: em casos de doenças do músculo esquelético do coração há aumento do colágeno, fibrose, espessamento e rigidez muscular levando a um déficit de relaxamento (Hayashi et al., 1998). O mais importante papel biológico da MEC é a integração entre as células e os tecidos, influenciando múltiplas funções celulares, como morfogênese, desenvolvimento, regulação da proliferação celular. Além disso, a MEC promove suporte mecânico, resistência e elasticidade aos tecidos (Labat-Robert et al., 1988; Pardo, 1996; Kovanen, 2002).

A composição da matriz extracelular é dada por quatro componentes: o colágeno, a elastina, os proteoglicanos e as glicoproteínas estruturais (como a fibronectina e laminina). O colágeno e a elastina formam o arcabouço fibroso do tecido conectivo, enquanto os proteoglicanos e as glicoproteínas estruturais preenchem o interstício e fazem a interface entre a célula e a MEC (Labat-Robert et al. 1990). As metaloproteinases estão implicadas na degradação dos componentes da MEC (Pardo, 1996). A MEC do músculo esquelético se organiza em níveis, sendo o endomísio o de maior contato com a célula muscular (Kovanen, 2002). Modificações na MEC, por alteração nos seus componentes, no colágeno, fibras elásticas, proteoglicanos, versican, metaloproteinases, seja por fatores externos, genéticos, ou inflamações, podem alterar o comportamento celular levando à instalação de processos patológicos (Labat-Robert et al., 1990).

As fibras colágenas, devido às suas propriedades estruturais, conferem coesão e força mecânica aos tecidos musculares e funcionam, ainda, como um sistema elástico, amortecendo o estresse da contração, bem como contribuindo para a efetiva contração no músculo e tendão (Takala, Virtanen, 2000). O colágeno além de ser o componente mais abundante da MEC, constitui cerca de 20-25% de todas as proteínas do corpo (Waterlow et al., 1978). Os tipos I e III do colágeno são os mais abundantes no músculo esquelético (Kovanen, 2002), sendo que o tipo I confere resistência, enquanto o tipo III, mais elasticidade aos tecidos (Junqueira, Carneiro, 2005). Nas situações de fibrose muscular, como a distrofia de Duchene observa-se um aumento da expressão destes componentes no músculo, sugerindo um processo de remodelamento tecidual, que altera as propriedades funcionais do músculo (Foidart et al., 1981).

O sistema elástico é formado pelas fibras oxitalânicas, eaulínicas e elásticas, com quantidades crescentes de elastina. As fibras elásticas, que contém grande quantidade de elastina, atuam absorvendo o choque do estiramento e compressão dos tecidos, enquanto os outros tipos de fibras do sistema elástico estão associadas à resistência mecânica (Cotta-Pereira et al., 1976). Algumas entidades estão associadas a alterações funcionais das fibras elásticas. A doença de Marfan, por exemplo, é causada por mutações no gene da fibrilina, que é um componente das fibras elásticas, causando uma flacidez nos músculos esqueléticos, e interessantemente, observa-se uma alta prevalência de SAOS nestes pacientes e um aumento da colapsibilidade da via aérea superior (Cistulli Sullivan, 1993; Cistulli, Sullivan, 1995; Ramirez, 1999). Ainda alterações qualitativas como, desorganização das fibras elásticas na musculatura da úvula, foi também detectada nos pacientes com SAOS (Sériès et al., 2004).

Os proteoglicanos são um grupo heterogêneo de proteínas ligadas a uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos. Podem ligar-se aos próprios componentes da MEC ou mediar ligações entre a célula e a MEC, contribuindo com a atividade de adesão celular, regulação da motilidade celular, crescimento e diferenciação tecidual (Ruoslahti, 1989). Apresentam, ainda, uma função biológica de hidratação dos tecidos, criando um edema intersticial e conseqüente aumento da resistência contra forças de compressão (Yanagashita, 1993). Existe uma diversidade de tipos de proteoglicanos identificados, dentre estes, o grande proteoglicano de agregação chamado versican, que está presente, em geral, na MEC do músculo esquelético, particularmente no endomísio (Bode-Lesniewska et al., 1996).

O processo de degradação ou catabolismo dos componentes da MEC é responsabilidade das metaloproteinases (MMPs), que representam uma classe de

enzimas, zinco-dependentes, que têm um papel em processos normais e patológicos, incluindo embriogênese, cicatrização de feridas, inflamação, artrite e neoplasias (Massova et al., 1998; Nagasse, Woessner, 1999). Uma vez que a MEC funciona como uma barreira à migração celular, a sua degradação facilita a migração celular e, altera o microambiente da MEC e o comportamento das células de dño tecido, levando à proliferação, apoptose ou morfogênese, e ainda, à modulação da atividade de moléculas biologicamente ativas (como os fatores de crescimento) (Vu, Werb, 2000). No músculo esquelético, as MMPs interferem no crescimento, desenvolvimento e nos processos funcionais e patológicos das fibras musculares. Observa-se aumento da expressão das MMPs em miopatias inflamatórias, e fibróticas, como a distrofia de Duchene (Kiesseier et al., 2001; Carmeli et al., 2004).

A fibronectina é definida como uma glicoproteína grande que pode ser encontrada na corrente sanguínea na forma solúvel e nos tecidos conectivos na forma insolúvel. Ela tem a propriedade de se ligar aos colágenos tipos I, II e III, proteoglicanos, heparina, ácido hialurônico, fibrina, componentes da superfície celular e parede celular das bactérias, tendo um papel de organizar a formação da MEC, atuando como proteína de adesão para um crescimento ordenado e posicionamento adequado das células (Mosher, Furcht, 1981). O aumento da síntese de fibronectina pode ser encontrado nos processos de desenvolvimento, injúria tecidual ou remodelamento (Scheler et al., 1998). No músculo esquelético, observa-se a fibronectina no endomísio e perimísio de músculos normais e seu acúmulo nos músculos desnervados e/ou atrofiados, e também esta presente nos músculos regenerados e isquêmicos (Salonen et al., 1985; Willems et al., 1996; Kannus et al., 1998; Gulati et al., 2004).

Existe uma evolução da respiração noturna normal em direção ao ronco e SAOS que envolve aumento da flacidez da parede lateral. O papel da MEC nas propriedades estruturais da musculatura faríngea é desconhecido. Não se conhecem os fatores determinantes da complacência de um músculo esquelético na ausência de tônus. O estudo de Schwab (1995), sugere que a maior espessura da parede lateral muscular está relacionada com uma maior complacência. Talvez a MEC desempenhe um papel relevante neste aspecto. Não encontramos estudos de quantificação dos componentes da MEC na musculatura da parede lateral da faringe.

## **1.1 OBJETIVOS**

É de fundamental importância o conhecimento da histoarquitetura da musculatura da parede lateral da faringe para elucidar as alterações estruturais e funcionais desta região em portadores de SAOS, roncadores simples e controles não roncadores. Para isto desenvolvemos este estudo com o objetivo de:

- 1- Descrever a composição da MEC do endomísio da musculatura da parede lateral da faringe em pacientes com SAOS, em roncadores simples e em controles não roncadores sem SAOS;
- 2- Comparar a densidade dos componentes da MEC entre os três grupos em estudo;
- 3- Verificar a influência dos fatores antropométricos (idade, índice de massa corpórea) na composição da MEC.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

---

## 2.1 ESTRUTURA DA PAREDE LATERAL DA FARINGE

Hollinshead (1994) se refere aos músculos constritores superior, médio e inferior da faringe como os principais componentes das paredes posterior e lateral da faringe. Detalha que são músculos pares que se reúnem e se inserem na linha média posterior formando a rafe faríngea. Estes músculos são recobertos externamente por uma delgada fáscia chamada bucofaríngea, enquanto que na superfície interna ou luminal são recobertos pela fáscia faringobasilar, que se apresenta bem marcada na região mais alta da faringe, tornando-se quase inexistente no nível abaixo das tonsilas palatinas. Descreve ainda, que o músculo constritor superior se insere na base do crânio e na rafe faríngea posterior, caminhando na direção ântero-inferior para inserir-se na rafe pterigomandibular, mandíbula e porção lateral da base da língua, formando os fascículos pterigofaríngeo, bucofaríngeo milofaríngeo e glossofaríngeo.

Gnepp, Souther (2000) avaliam a incidência de músculo esquelético em amostras de tonsilas de 50 pacientes submetidos a tonsilectomia por hiperplasia tonsilar, divididos em dois grupos, retrospectivo e prospectivo, respectivamente. Observam que o músculo esquelético é muito freqüentemente encontrado em 83% das tonsilas no primeiro grupo e 100% no segundo e são localizados profunda ou lateralmente ao tecido linfóide hiperplásico e classificados, na maioria dos casos, como abundantes em ambos os grupos. Afirmam que o achado do tecido muscular nas tonsilas não é resultado de técnica cirúrgica inapropriada ou agressiva, não explicando qualquer complicação cirúrgica.

Erkiliç et al. (2002) observam uma incidência de 89% de músculo esquelético em amostras de tonsilas de 1120 casos de pacientes com idades entre 1 mês e 73 anos



submetidos a tonsilectomia e retrospectivamente avaliados. Na maior parte dos casos o tecido muscular é quantificado como multifocal e abundante.

Ohtsuka (2002) et al. através de estudo anatômico e histológico em 83 cadáveres humanos, descrevem a composição muscular de 107 leitos tonsilares e observam uma importante variabilidade anatômica entre os indivíduos e entre os dois lados de um mesmo indivíduo. Detalham três tipos de relações musculares com as tonsilas palatinas: tipo B, encontrado em 55,1% dos espécimes, formado pelo músculo constritor superior e parcialmente pelos músculos estilofaríngeo e palatofaríngeo; tipo C, encontrado em 21,5% das amostras, composto pelo músculo constritor superior e um espaço com ausência de leito muscular, mantendo a cápsula tonsilar próxima a estruturas vaso-nervosas e; o tipo A, observado em 23,4% dos casos, formado quase completamente pelo músculo constritor superior e lateral a este o estiloglosso. Analisam ainda, histologicamente a cápsula tonsilar, que foi claramente definida como uma camada espessa de tecido conectivo aderida intimamente a tonsila, em alguns casos, enquanto em outros, foi visto apenas um tecido conectivo mais frouxo entre a tonsila e a camada muscular. Sugerem que a cápsula tonsilar pode ser confundida com o tecido de revestimento da musculatura do leito tonsilar.

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA DA SAOS E TRATAMENTO CIRÚRGICO

A American Sleep Disorders Association (1996) afirma que a uvulopalatofaringoplastia pode ser indicada nos pacientes com estreitamento retropalatal, ressaltando que uma boa avaliação pré-operatória não garante o sucesso do tratamento e que a eficácia dessa cirurgia é, geralmente, variável.

Young et al. avaliam uma população de 602 indivíduos entre 30 e 60 anos e estimam que a prevalência da SAOS é 2% em mulheres e 4% em homens. Observam que esta prevalência aumenta com o aumento da idade e com o IMC (índice de massa corpórea). Estes últimos são considerados fatores de risco para o desenvolvimento da SAOS.

Cahali (2003) descreve uma nova técnica cirúrgica para tratamento do ronco e SAOS que manipula diretamente a musculatura da parede lateral da faringe, especificamente, o músculo constritor superior da faringe, com o objetivo de dar suporte a esta região.

Cahali et al.(2004) dividem 27 pacientes com indicação cirúrgica para tratamento da SAOS, randomicamente em dois grupos: uvulopalatofaringoplastia e faringoplastia lateral. Observam após comparar as duas técnicas, que a faringoplastia apresenta resultados superiores tanto clínicos, quanto polissonográficos.

Quilliot et al., (2005) relatam que a obesidade modifica o *turnover* de colágeno no músculo esquelético cardíaco, podendo alterar sua funcionalidade.

### **2.3 PAPEL DA MUSCULATURA DA PAREDE LATERAL DA FARINGE NA FISIOPATOLOGIA DA SAOS**

Guilleminault et al. (1978), através de estudo por nasofibrosopia associado a polissonografia durante o sono, demonstram que o colapso durante os episódios de apnéia ocorrem sempre na orofaringe, e se inicia com a progressiva oposição de suas paredes laterais e posteriores, precedendo os movimentos posteriores da língua. Analisam ainda que em pacientes normais durante o sono há reduzido nível de atividade eletromiográfica dos músculos constritores faríngeos, mas ocorrem contrações inspiratórias do músculo estilofaríngeo. Nos pacientes com SAOS, contudo, durante as apnéias, os autores notam uma redução significativa ou ausência completa da atividade eletromiográfica dos músculos palatoglosso, palatofaríngeo, genioglosso, constritor superior e inferior da faringe e estilofaríngeo, sem alterações na atividade do estilo-hióide e constritor inferior da faringe.

Schwab et al. (1995) avaliam, através de ressonâncias magnéticas, a via aérea superior de pacientes com SAOS moderada ou acentuada, de roncoadores primários ou com SAOS leve e de voluntários sem roncos ou SAOS, verificando que, em todos os grupos, a área mais estreita da faringe é a retropalatal e, examinando esta área, observam que as pessoas sem roncos ou SAOS têm uma área retropalatal maior que a dos outros grupos às custas de uma maior dimensão lateral da luz da faringe. Ressaltam que o estreitamento lateral observado nos grupos com roncos ou SAOS deve-se ao espessamento das paredes laterais musculares da faringe e não a alterações esqueléticas e nem à deposição de gordura nos espaços látero-faríngeos,

não apoiando o conceito de compressão extrínseca da faringe causando a redução da via aérea superior na SAOS.

Schwab et al. (1996) estudam, através de ressonâncias magnéticas, os efeitos do CPAP nasal na via aérea superior de 10 indivíduos sem SAOS ou roncos, em vigília, e demonstram que o aumento da pressão deste aparelho amplia a faringe lateralmente e reduz a espessura da parede lateral da faringe, tendo mínima ação sobre o palato mole e a língua.

Kuna, Smickley (1997) investigam, eletromiograficamente, a ação do músculo constritor superior da faringe em 18 pacientes com SAOS acentuada e notam que a atividade deste músculo decresce, ou some, no início das apnéias e também durante o uso do "CPAP" nasal e, ao término das apnéias, ele apresenta ativação durante a inspiração, semelhante ao comportamento dos dilatadores faríngeos. Reforçam o conceito de que a contração dos constritores faríngeos não é necessária para causar apnéias e sugerem que, com a faringe fechada, a contração do músculo constritor pode reduzir a sua própria espessura e, paradoxalmente, dilatar a via aérea superior.

Isono et al. (1997) estudam 40 pacientes com SAOS e 17 controles pareados pelo IMC (índice de massa corpórea) sob anestesia geral, com paralisia total da musculatura. Estabelecem a relação entre a pressão de fechamento da faringe e sua área, através da indução de apnéia temporária e submissão a variações de pressão controladas pelo examinador, e concluem que a faringe dos pacientes com SAOS é estruturalmente mais estreita e também mais colapsável do que a dos pacientes sem SAOS. Supõem que a redução da luz da faringe não seria atribuída à diminuição da atividade da musculatura dilatadora, mas sim devido à flacidez estrutural do tubo faríngeo.

Trudo et al. (1998) evidenciam através de avaliações por ressonância magnética em pacientes normais, comparando o sono com a vigília, que o volume e a área retropalatal diminuem significativamente durante o sono, o que não ocorre com a área retroglossal, e ainda, que este estreitamento é atribuído a um aumento da espessura da parede lateral muscular da faringe.

Li et al. (2002) estudam, através de endoscopias faríngeas e radiografias cefalométricas laterais, 12 pacientes com SAOS tratados cirurgicamente com avançamento maxilomandibular. Notam que ambos os exames comprovam haver redução no estreitamento da via aérea após as cirurgias e que, apesar de haver melhora no retroposicionamento da base da língua, a melhora na estabilidade da parede lateral da faringe é a alteração mais relevante encontrada. Sugerem que estes achados podem explicar o elevado sucesso alcançado com o avanço maxilomandibular no tratamento da SAOS.

Schwab et al. (2006), por meio de estudo por ressonância magnética volumétrica em pacientes com SAOS e controles irmãos e em pacientes com SAOS e controles não parentes confirmam que algumas características como aumento de volume da parede lateral da faringe têm caráter hereditário, com comprovada agregação familiar.

## 2.4 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA MUSCULATURA DA VIA AÉREA SUPERIOR

Woodson et al. (1991) estudam amostras da úvula e parte distal do palato mole de 8 pacientes divididos entre roncoadores sem SAOS e com apnéia severa submetidos a uvulopalatofaringoplastia, e de 4 cadáveres, sem história prévia de roncos contínuos. Demonstram alterações musculares como fibrose intersticial, com atrofia e/ou hipertrofia das fibras musculares, tantos nos pacientes roncoadores, como nos apnéicos, sem diferença estatística. Sugerem que estas alterações sejam conseqüentes ao trauma vibratório causado pelo ronco, e que a hipertrofia muscular se ocorrer de forma disseminada pode espessar as paredes musculares, afetando a permeabilidade da faringe.

Sekosan et al. (1996) identificam um aumento da contagem de células inflamatórias na mucosa da úvula de pacientes com SAOS. Supõem que a inflamação contribui para a oclusão da via aérea superior, durante o sono nestes pacientes.

Ferini-Strambi et al. (1998) analisam morfológicamente o músculo constritor médio da faringe, através de biópsias em 22 pacientes com SAOS e sem SAOS ou roncos, com neoplasia de laringe durante laringectomia total. Notam uma desproporção entre os tipos de fibras musculares, com alto percentual de fibras de contração rápida, tipo IIA e baixo percentual de fibras de contração lenta, tipo I nos pacientes com SAOS. Acrescentam aos pacientes em estudo biópsia do músculo vasto lateral, com proporcional distribuição dos tipos de fibras entre os dois grupos. Fazem a hipótese de que esta patologia muscular seletiva da faringe de pacientes com SAOS seja decorrente de uma adaptação das fibras musculares induzida pela sobrecarga de atividade requerida nestes pacientes.

Friberg et al. (1998) realizam biópsias do músculo palatofaríngeo em 21 pacientes com roncos e/ou SAOS submetidos a uvulopalatofaringoplastia e 10 pacientes controles submetidos a tonsilectomia. A análise morfológica mostra grande variabilidade no tamanho das fibras musculares, fibras rompidas, além de sinais de específicos de lesão neurogênica, denotada pela atrofia muscular, em grau significativamente aumentado nos doentes, enquanto que os controles exibem anormalidades leves. Mostram que o grau destas alterações morfológicas se correlaciona significativamente com a obstrução respiratória.

Carrera et al. (1999) estudam amostras de biópsias de músculo genioglosso em três grupos: pacientes com SAHOS na ocasião do diagnóstico, pacientes com SAOS em uso de "CPAP" há pelo menos um ano e pessoas sem SAOS. Os autores encontram algumas alterações estruturais e funcionais, como maior fatigabilidade muscular e uma desproporção dos tipos de fibras musculares, com aumento significativo das fibras tipo II nesses músculos, nos casos de SAHOS sem tratamento, havendo total correção dessas alterações com o uso do "CPAP". Devido a isso, sugerem que as anomalias encontradas nos músculos genioglossos são uma consequência e não causa da SAOS.

Sériès et al. (2000) comparam morfológicamente, através de análise histoquímica, a musculatura da úvula em pacientes com SAOS e roncadores e encontram que apesar dos pacientes com SAOS exibirem uma alta proporção de fibras tipo IIA, a frequência de distribuição por área das fibras musculares entre os dois grupos foi semelhante. Sugerem que as apnéias não parecem causar um dano adicional à via aérea, comparado ao trauma vibratório do ronco sozinho.

Lindman, Stal (2002) analisam os músculos palatofaríngeo e da úvula de 11 pacientes submetidos a uvulopalatofaringoplastia com roncos e/ou SAOS e 5 cadáveres como controles, e percebem uma distribuição patológica dos tamanhos das fibras musculares, aumento da proporção de fibras musculares tipo IIa e achados compatíveis com miopatia, com sinais de injúria e regeneração tecidual.

Paulsen et al. (2002) observam por meio de análise imunohistoquímica uma infiltração inflamatória na mucosa da úvula de pacientes roncadores e apnéicos. De acordo com seus achados, consideram relevante a hipótese de ocorrerem alterações estruturais progressivas na mucosa causada pelo trauma vibratório do ronco.

Boyd et al. (2004) encontram evidências de um processo ativo de desnervação e reinervação, e um aumento de células inflamatórias em amostras de músculos dos pilares tonsilares e/ou palato mole dos pacientes com SAOS, em relação aos controles não roncadores. Sugerem que estes distúrbios neurais eferentes podem produzir disfunção contrátil e fraqueza muscular.

## **2.5 PAPEL DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) NO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Labat-Robert, Robert (1988) referem que o papel biológico mais importante da MEC é a integração das células nos tecidos, dos tecidos nos órgãos e dos órgãos em todo o organismo. A MEC influencia o comportamento celular através do contato entre a MEC e o genoma mediada por seus componentes, ou seja, glicoproteínas estruturais, macromoléculas (colágeno, proteoglicanos, elastina) e ainda por receptores transmembrana.



Labat-Robert et al. (1990) descrevem que a matriz extracelular é composta por 4 componentes: o colágeno, a elastina, os proteoglicanos e as glicoproteínas estruturais (como a fibronectina, laminina). O colágeno e a elastina formam o arcabouço fibroso do tecido conectivo, enquanto que os proteoglicanos e as glicoproteínas estruturais preenchem o interstício, ou seja, o espaço entre as fibras do arcabouço, e fazem a interface entre a célula e a matriz extracelular. Estes autores ilustram que a MEC é formada de acordo com fatores geneticamente determinados e interfere diretamente na célula regulando seu funcionamento. Concluem que modificações na MEC, seja, por fatores externos ou inflamações, podem alterar o comportamento celular, levando a instalação de processos patológicos.

Pardo, Selman (1996) definem a MEC como um complexo insolúvel de proteínas e carboidratos encontrados fora do ambiente celular e entre as estruturas epiteliais e endoteliais, de animais multicelulares. Consideram a MEC como tendo um papel essencial em múltiplas funções celulares, incluindo morfogênese e desenvolvimento e o maior participante da regulação da proliferação celular, diferenciação, migração e adesão. Discutem que equilíbrio dinâmico da MEC é consequência de um balanço entre a síntese e a degradação de seus componentes e uma remodelação desequilibrada das moléculas da MEC tem sido associada a alguns processos patológicos.

Segundo Takala, Virtanen (2000), a MEC do músculo esquelético tem sua função dinâmica durante a diferenciação e o crescimento muscular e serve como estrutura de suporte ao músculo e ao tendão.

Kovanen (2002) detalha que a MEC intramuscular tem normalmente três níveis de organização: o epimísio, ou fáscia, que envolve o músculo esquelético por

inteiro; o perimísio que une unidades funcionais maiores chamadas feixes, que é o conjunto de fibras musculares; e o endomísio que recobre uma fibra muscular individual, adjacente à membrana basal da célula muscular e à camada reticular, que é uma rede de colágeno formando uma continuidade entre a membrana basal das células musculares vizinhas.

### **2.5.1 PAPEL DAS FIBRAS COLÁGENAS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Segundo Waterlow et al (1978) o colágeno é a proteína mais abundante da MEC, constituindo cerca de 20-25% de todas as proteínas do corpo.

Kurosu (1979) demonstra a distribuição dos tipos de colágeno no músculo esquelético de humano e observa a composição de 80% de colágeno tipo I, 19% do tipo III e 1% do colágeno tipo IV.

Foidart et al (1981) estudam a distribuição do colágeno I, III e IV em músculo esquelético normal e fibrótico de humanos através da técnica de imunofluorescência. Observam que no músculo normal o colágeno tipo I, III e fibronectina foram encontrados no endomísio e perimísio, e o colágeno tipo IV se restringiu à membrana basal. Já nos pacientes com distrofia muscular de Duchene, dermatomiosite e polimiosite, houve um aumento significativo na fibrose do endomísio e perimísio, às custas do depósito do colágeno tipo I, III e fibronectina nestas regiões.

Sawai (1982) observa o efeito da desnervação em músculo esquelético de ratos e encontra um aumento na formação de fibras colágenas imaturas, responsável por uma fibrose progressiva.

Montes, Junqueira (1988), se referem a dois métodos principais para identificação do colágeno, a imunohistoquímica e o método da Picrossírius-polarização, que contribuem significativamente para uma melhor compreensão da função e biologia do colágeno.

Tsuji (1989) demonstra que após neurectomia em ratos há um acúmulo de colágeno tipos I e III no músculo esquelético, com formação de tecido fibrótico.

Montes, Junqueira (1991) descrevem o método da Picrossírius-polarização, que consiste na coloração tecidual pelo Sirius Red, para identificação do colágeno, através do aumento da birrefringência normal, específica para estruturas colagenosas, compostas de agregados de moléculas orientadas. Trata-se, segundo os autores, de um método, simples, sensível, confiável e barato, que permite ainda, uma localização e caracterização precisa das fibras de colágeno nos tecidos, obtendo uma boa correlação entre os achados morfológicos e histoquímicos.

Montes (1996) relata que o termo colágeno se refere a uma família de glicoproteínas que contém diferentes entidades histológicas, como fibras colágenas, fibras reticulares, membrana basal, dentre outras. Descreve ainda o método da resorcina-fucsina de Weigert com oxidação prévia, como uma técnica sensível para identificação de todos os tipos de fibras elásticas.

Hayashi et al. (1998) relacionam a cardiomiopatia restritiva idiopática a um aumento na expressão do colágeno tipo III, levando possivelmente a um espessamento do ventrículo esquerdo, e da metaloproteinase-1, provavelmente envolvida na fisiopatologia desta entidade.

Takala, Virtanen (2000) descreve que o colágeno origina ligações entre o músculo e seu tecido colagenoso associado, como os tendões e as fâscias e também

entre células musculares individuais e entre as células e os pequenos vasos e nervos adjacentes. Esta estrutura confere coesão e força mecânica aos tecidos e funciona ainda como um sistema elástico, amortecendo o estresse da contração, bem como contribuindo para a efetiva contração no músculo e tendão. A força de tensão conferida pela molécula do colágeno é baseada nas ligações cruzadas intra ou intermoleculares e na orientação e densidade das fibrilas e fibras. Acrescentam ainda que o colágeno, assim como os outros componentes da MEC ajustam-se ao microambiente ao redor das fibras musculares e participam do crescimento das células e regeneração tecidual após o dano.

Kovanen (2002) detalha que mais de 19 tipos distintos de colágeno tem sido encontrados nos vertebrados. A propriedade comum a todos os colágenos é que são formadas por três cadeias de polipeptídeos, chamadas cadeias  $\alpha$ , reunidas em uma estrutura helicoidal em tripla hélice, que podem ser contínuas ou interrompidas. No músculo esquelético o colágeno é principalmente presente em 3 formas fibrilares, colágeno tipo I, III e V, e uma forma não fibrilar, o tipo IV na membrana basal. Destes os mais abundantes no músculo esquelético são os tipos I e III. O colágeno é sintetizado principalmente pelos fibroblastos nos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso, e ocorre uma série de modificações nas cadeias de polipeptídeos, que contribui para qualidade e estabilidade da molécula do colágeno. A degradação do colágeno é dada pelas metaloproteinases da matriz (MMPs), a nível extracelular, que por sua vez é regulada pelos tecidos inibidores das metaloproteinases (TIMP). A expressão das MMPs é aumentada em geral, em processos envolvendo remodelação tecidual e migração celular, como cicatrização de feridas, inflamações.

Junqueira, Carneiro (2005) descrevem que os colágenos tipos I e III são do tipo fibrilar, ou seja, formam fibras. O colágeno tipo III após secretado no meio extracelular, tem suas moléculas associadas paralelamente formando fibrilas, que novamente se agrupam gerando delgadas fibras, chamadas fibras reticulares, com 1-4 $\mu$ m de diâmetro, visíveis ao microscópio óptico. No colágeno tipo I, o processo vai mais adiante, constituindo fibras mais espessas, que em geral se associam, formando feixes de fibras com até 20 $\mu$ m, chegando ao que habitualmente se chama de fibras de colágeno. O colágeno tipo III é encontrado principalmente em tecidos que alteram seu volume e forma com frequência, conferindo a estes tecidos uma elasticidade limitada importante para estes órgãos. O colágeno tipo I apresenta fortes ligações entre suas fibrilas, promovendo resistência aos tecidos.

### **2.5.2 PAPEL DAS FIBRAS ELÁSTICAS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Ross (1973) demonstra que a fibra elástica é composta por microfibrilas, cerca de 8% e por elastina em aproximadamente 92%, sendo principalmente este último componente que confere propriedades elastoméricas aos tecidos.

Cotta-Pereira et al. (1976) descrevem o sistema elástico, por meio de estudo em pele humana por microscopia óptica e eletrônica. Utilizando microscopia óptica detectam três tipos de fibras: oxitalânicas, eaulínicas e elásticas, com diferentes diâmetros e características tintoriais, distribuídas em camadas superficial, intermediária e profunda da derme respectivamente. A microscopia eletrônica acrescenta que as fibras oxitalânicas são formadas por feixes de microfibrilas tubulares, enquanto que as eaulínicas apresentam material amorfo esparso e nas

elásticas este componente é abundante e compacto com reduzida quantidade de microfibrilas. Concluem que os três tipos de fibras correspondem provavelmente a estágios consecutivos do desenvolvimento do sistema elástico e especulam que as fibras elásticas, devido a sua grande quantidade de elastina, atuam absorvendo o choque do estiramento e compressão dos tecidos, enquanto as fibras superficiais estariam associadas à resistência mecânica.

Cistulli, Sullivan (1993) estudam a prevalência de SAOS em 25 pacientes com doença de Marfan (doença autossômica dominante caracterizada por alteração no tecido conectivo dos músculos esqueléticos, olhos e sistema cardiovascular), comparado ao grupo controle, pareados por idade, altura e peso. Mostram que 64% dos pacientes com doença de Marfan apresentam IAH  $> 5$  com uma média de  $20 \pm 3$  e confirmam a elevada prevalência de SAOS nos pacientes com esta patologia.

Cistulli, Sullivan (1995) observam um aumento da colapsibilidade da via aérea superior durante o sono em 12 pacientes com doença de Marfan, destes, 10 também apresentavam SAOS de acordo com a polissonografia, em relação aos controles. Os autores supõem que este aumento na colapsibilidade da via aérea, esteja possivelmente relacionado ao tecido conectivo defeituoso, característico desta desordem.

Montes (1996) considera o método de coloração da resorcina fucsina de Weigert com oxidação prévia o mais sensível, em microscopia óptica, com detecção dos três tipos de fibras do sistema elástico, eaulínicas, oxitalânicas e elásticas.

Ramirez et al. (1999) dicorrem que a fibrilina 1 é um importante componente das microfibrilas e pode existir associada a elastina formando as fibras elásticas, ou isoladamente e detalham que altos níveis de mutações dominantes na fibrilina são necessários para causar a doença de Marfan, com seus vários fenótipos de apresentação.

Kielty et al. (2002) referem que as fibras elásticas conferem aos tecidos uma grande capacidade de deformabilidade e recolhimento passivo, sem o gasto de energia. Discutem que as fibras elásticas de acordo com seu arranjo apresenta funções específicas em diferentes tecidos. Exemplifica a aorta e as artérias elásticas, que devido a sua disposição conferem elasticidade e resistência à parede dos vasos; nos pulmões estão presentes como fina camada na árvore respiratória, e suportam a expansão e recolhimento alveolar; nas cartilagens articulares a rede de fibras elásticas associada as fibras colágenas respondem pela deformabilidade do tecido. Referem que as propriedades funcionais e biomecânicas das fibras elásticas são fornecidas pela elastina e não pelas microfibrilas.

Sériès et al. (2004) investigam histologicamente, por meio de imunohistoquímica, a úvula dos seguintes grupos de pacientes: roncoadores, SAOS com IMC equivalente aos roncoadores e SAOS com obesidade. Percebem uma desorganização no arranjo das fibras elásticas da parte distal da úvula, mais significativa na mucosa em relação ao músculo, de pacientes com SAOS independente do peso. Percebem que o grau de desorganização ao redor do músculo da úvula, não apresenta correlações funcionais significantes. Concluem que a SAOS é associada a alterações estruturais da MEC dos tecidos da via aérea superior.

### **2.5.3 PAPEL DOS PROTEOGLICANOS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Ruoslahti (1989) conceitua os proteoglicanos como um grupo heterogêneo de proteínas ligadas a uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos. Os proteoglicanos podem ocorrer em diversos tamanhos e formas, e sua única característica comum parece ser a presença dos glicosaminoglicanos. Podem ligar-se aos próprios

componentes da MEC, mediar ligações entre a célula e a MEC e capturar moléculas solúveis como fatores de crescimento na MEC e na superfície celular, podendo desta forma contribuir com a atividade de adesão celular, e ainda na regulação da motilidade celular, crescimento e diferenciação tecidual.

Fadic et al. (1990) isolam proteoglicanos de músculo esquelético de ratos e estudam as alterações pós-desnervação muscular. Observam que ocorre um aumento da incorporação de glicosaminoglicanos (sulfatos) aos proteoglicanos da MEC do músculo esquelético e, por isso, inferem que a desnervação leva a um aumento da síntese dos proteoglicanos.

Yanagishita (1993) revisa a estrutura e função dos proteoglicanos. Atribui aos glicosaminoglicanos, sua principal função biológica, a de hidratação dos tecidos, levando a um edema, e um conseqüente aumento da resistência contra forças de compressão tecidual. Conceitua ainda os glicosaminoglicanos como polímeros de dissacarídeos altamente sulfatados e classifica-os em três tipos, baseado no componente carboidrato: 1) Condroitim e dermatam sulfato; 2) heparam sulfato e heparina e; 3) keratam sulfato.

Bode-Lesniewska et al. (1996) estudam a distribuição do grande proteoglicano de agregação versican (isoformas V0 e V1), em tecidos de humanos adultos através da técnica de imunohistoquímica. O versican está presente na maioria dos casos no tecido conectivo frouxo de vários órgãos, freqüentemente associado às fibras elásticas, mas é também observado alheio a este tecido, como nas fibras musculares lisas, epitélio e sistema nervoso. No músculo esquelético o versican se restringiu à MEC, ou seja, endomísio, perimísio e epimísio. O endomísio particularmente se mostrou rico em versican. Os autores sugerem que a alta



diversidade de distribuição do versican nos tecidos de adultos normais, pode refletir sua versatilidade funcional. Sugerem ainda, que em relação às fibras elásticas, o versican pode contribuir para sua maior elasticidade prevenindo a aderência entre estas fibras.

Zanotti et al. (2007) utilizando análise genética em amostra de biópsias de músculo quadríceps de 7 pacientes com distrofia muscular de Duchenne e 5 pacientes sadios, relatam baixos níveis do proteoglicano decorina e altos níveis do TGF- $\beta$  (agente que favorece a fibrose) nos pacientes doentes. Indicam que o desbalanço com aumento do TGF- $\beta$  e redução da decorina favorece o processo de fibrose muscular da distrofia de Duchenne.

#### **2.5.4 PAPEL DAS METALOPROTEINASES DA MATRIZ NO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Massova et al. (1998) descrevem que as metaloproteinases da matriz (MMP) são endopeptidases zinco-dependentes com capacidade de clivagem dos constituintes da MEC e também de proteínas não localizadas na matriz. São organizadas em três domínios básicos baseados nas suas considerações estruturais: 1) um propeptídeo amino-terminal, que contém o aminoácido cistina que interage com o zinco sendo responsável por manter as MMPs forma inativa; 2) domínio catalítico, que contém dois íons zinco e um íon cálcio ligado, essencial para a atividade proteolítica e estabilidade da MMP e o 3) domínio hemopexina-like, que confere a capacidade de ligação com alguns componentes da MEC e moléculas de adesão. Algumas MMPs (MMP-2 e MMP-9) contêm um domínio adicional fibronectina tipo II-like.

Acrescentam que existe uma forte evidência do papel das MMPs em processos normais e patológicos, incluindo embriogênese, cicatrização de feridas, inflamação, artrite e neoplasias.

Nagasse, Woessner (1999) relatam que as MMPs representam uma classe de enzimas (proteínases) responsáveis pelo processo de degradação ou catabolismo da MEC, que é um fenômeno necessário para o desenvolvimento embriológico, morfogênese, reprodução e reabsorção e remodelamento tecidual. São sintetizadas como pró-enzimas e secretadas na sua forma inativa (zimogênio) e a atividade proteolítica das MMPs é controlada durante a ativação dos seus precursores e inibida por inibidores endógenos chamados, tecidos inibidores de metaloproteinases (TIMP).

Vu, Werb (2000) revisam as principais funções da MMPs: 1) facilita e modula a migração celular, através da degradação de moléculas da MEC (que funciona como barreira à migração celular) e regulação dos sítios de adesão e quimioatração; 2) altera o microambiente da MEC e modifica o comportamento celular levando à proliferação, apoptose ou morfogênese e 3) modula a atividade de moléculas biologicamente ativas (como os fatores de crescimento) por clivagem direta ou regulação dos seus inibidores.

Kieseier et al. (2001) investigam a expressão das MMPs em biópsias musculares de pacientes com miopatias inflamatórias (polimiosite, dermatopolimiosite), e como controles pacientes com distrofias musculares não inflamatórias. Identificam um aumento da expressão da MMP-1 e MMP-9 por meio da reação da polimerase em cadeia nos pacientes com miopatias inflamatórias e por imunohistoquímica localizam a MMP-1 no endomísio de fibras musculares

hipotróficas e no núcleo celular. Sugerem que devido a localização particular da MMP-1 há evidências do seu envolvimento no remodelamento do tecido muscular.

Carmeli et al. (2004) revisam o papel das MMPs no músculo esquelético, as quais têm sido implicadas em processos de crescimento, desenvolvimento, processos funcionais e fenômenos patológicos das fibras musculares. Acrescentam que um desbalanço na taxa de uma MMP e seu tecido inibidor pode se manifestar como uma disfunção fisiológica resultando em desordens clínicas.

Zanotti et al. (2007) notam altos níveis de MMP-2, TIMP-1 e 2 e ainda do colágeno I e IV nos pacientes com distrofia muscular de Duchenne em relação aos pacientes saudáveis. Indicam que, as alterações dos componentes da MEC estão relacionadas ao processo fisiopatológico de fibrose muscular, característica da distrofia de Duchenne.

### **2.5.5 PAPEL DA FIBRONECTINA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Mosher, Furcht (1981) descrevem que a fibronectina é uma glicoproteína grande que pode ser encontrada na corrente sanguínea e outros fluidos do corpo na sua forma solúvel e nos tecidos conectivos e membranas basais na forma insolúvel. Em cultura a fibronectina é sintetizada por inúmeros tipos celulares, incluindo fibroblastos, células do endotélio vascular, mioblastos, células musculares lisas dentre outras. São então secretadas no meio, ligadas ao substrato e depositadas na MEC. A fibronectina se liga aos colágenos tipos I, II e III, proteoglicanos, heparina, ácido hialurônico, fibrina, componentes da superfície celular e parede celular de bactérias. Os autores sugerem que a interação entre o ácido hialurônico, heparina

sulfatado, colágeno e fibronectina pode ser importante na motilidade celular. Indicam que a fibronectina tem um papel de organizar a formação da MEC, atuando como proteína de adesão para um crescimento ordenado e posicionamento adequado das células.

Salonen et al. (1985) observam um acúmulo de fibronectina no endomísio e perimísio de músculo esquelético de ratos submetidos a desnervação com atrofia das fibras, em relação ao músculo normal. Notam que o aumento de fibronectina foi intimamente associado aos colágenos tipos I e III. Fazem a hipótese de que a fibronectina pode ser essencial para a integridade estrutural das fibras imaturas de colágeno recém-formadas.

Willems et al. (1996) avaliam alterações da MEC após infarto do miocárdio em humanos em diferentes momentos pós-infarto. Usando imunohistoquímica percebem a presença da fibronectina nas células musculares cardíacas isquêmicas precocemente, no entanto, 4 semanas pós-infarto, já havendo tecido cicatricial no miocárdio, a expressão da fibronectina foi extinguida.

Sechler et al (1998) criam sistemas *in vitro* que permitem examinar diretamente a resposta celular a diferentes tipos de MEC, baseados na proteína de adesão fibronectina. Sugerem que um aumento na síntese de fibronectina (durante o desenvolvimento, injúria tecidual ou remodelamento) pode modificar e regular a adesividade da célula aos tecidos, permitindo sua locação em sítios onde estão sendo requisitadas. Concluem que alterações na estrutura própria da fibronectina ou sua composição na MEC podem causar profundas modificações na morfologia celular, estrutura da MEC e no contato e sinalização das células e sua conexão com a MEC.

Kannus et al. (1998) estudam a localização e distribuição da fibronectina no músculo esquelético de ratos. Afirmam que a fibronectina pode ser detectada no endomísio e perimísio do músculo e observam sua distribuição na MEC e membranas basais das junções miotendinosas, miofasciais e ósteotendinosas, nos tendões e parede dos capilares das unidades músculo-tendinosas.

Gulati et al. (2004) investigam o padrão de distribuição da fibronectina em músculo esquelético normal e regenerado pela técnica de imunofluorescência indireta. As miofibras normais exibem a fibronectina como uma fina camada no endomísio. As fibras foram submetidas a degeneração e regeneração. Durante a degeneração a fibronectina desaparece do endomísio, ao mesmo tempo aparecendo no sarcoplasma, enquanto que no músculo regenerado a fibronectina novamente assume a distribuição inicial, na camada endomisial. Diferentemente do músculo normal, a regeneração levou a um aumento de tecido conectivo fibroso contendo fibronectina.

## **2.6 ALTERAÇÕES DA MEC DO MÚSCULO ESQUELÉTICO NO ENVELHECIMENTO**

Mays et al. (1988) mensuram as mudanças do colágeno I e III relacionadas à idade no músculo do coração, pulmão e pele de ratos. Observam uma redução do colágeno III na musculatura cardíaca em relação ao colágeno I, com a idade enquanto nos outros tecidos as alterações foram variáveis.

Souza (2002) revisa que com a idade ocorre uma maior concentração do colágeno nos tecidos e um aumento das ligações cruzadas intermoleculares. No músculo cardíaco, as fibras de colágeno tipo I parecem aumentar em número e espessura com o envelhecimento. O acúmulo do colágeno no miocárdio leva a um aumento da rigidez da musculatura, conseqüentemente afetando a funcionalidade muscular, usualmente refletida por um relaxamento incompleto do ventrículo durante a diástole.

## **3 MÉTODOS**

---

### **3.1 CASUÍSTICA**

Este estudo prospectivo incluiu 61 pacientes adultos, com idade mínima de 18 anos, não obesos  $IMC < 30$  com indicação de cirurgias faríngeas. Os pacientes foram divididos em três grupos: grupo controle, grupo ronco, portadores de ronco primário e grupo SAOS. Os pacientes do grupo ronco e SAOS foram submetidos à cirurgia de uvulopalatofaringoplastia (UPFP) e os pacientes do grupo controle à tonsilectomia palatina na Clínica Otorrinolaringológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de 2005 a 2006,

Este protocolo de pesquisa (nº 559/05) foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A assinatura do termo de consentimento informado foi obtida de todos os pacientes.

#### **3.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

- 1 - O Grupo controle foi composto por 14 pacientes adultos sem queixa de roncos ou sonolência diurna, com escala de sonolência de Epworth com pontuação menor do que 10 e polissonografia com índice de apnéia-hipopnéia (IAH)  $< 5$  eventos/hora e sem evidência de roncos. Estes pacientes apresentavam amigdalite crônica caseosa ou aguda de repetição.



- 
- 2 - No grupo ronco, os pacientes apresentavam um (IAH)  $\leq 10$  eventos/hora, distribuição do sono normal e sem queixas sonolência diurna ou fadiga.
  - 3 - No grupo SAOS, os pacientes referiam a presença de sonolência diurna excessiva ou dois ou mais dos seguintes sintomas: sufocação ou apnéia testemunhada durante a noite, despertares recorrentes, sono não repousante, fadiga durante o dia e diminuição da concentração, associados a um IAH  $> 5$  eventos/hora, diagnosticados por polissonografia de noite inteira. O grupo SAOS foi ainda estratificado em três subgrupos: apnéia leve ( $5 < \text{AHI} \leq 15$  eventos/hora, 8 pacientes), moderada ( $15 < \text{AHI} \leq 30$  eventos/hora, 12 pacientes) e grave ( $\text{AHI} > 30$  eventos/hora, 9 pacientes).
  - 4 - Os pacientes dos grupos ronco e SAOS apresentaram indicação de tratamento cirúrgico com uvulopalatofaringoplastia de acordo com os seguintes critérios:
    - a. Pacientes Friedman graus I e II para a posição do palato e no mínimo tamanho 2 para as tonsilas (Friedman et al., 2004).
    - b. Foram operados somente os pacientes que, à endoscopia flexível nasal e faríngea, realizada com os pacientes acordados e em posição sentada, apresentaram estreitamento na região retropalatal, tanto em repouso quanto à manobra de Muller, sem estreitamento retrolingual aparente.
    - c. Pacientes do grupo SAOS que se recusaram ou não toleraram a terapia com o CPAP e/ou aparelho intra-oral, ou não apresentaram melhora clínica; e pacientes do grupo ronco que não toleraram ou não apresentaram melhora clínica com perda de peso ou terapia intra-oral.
  - 5 - Todos os pacientes do estudo apresentavam IMC  $< 30 \text{ kg/m}^2$ .

### **3.1.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Foram excluídos do estudo os paciente portadores de doenças neuromusculares, exame sugestivo de obstrução retrolingual na endoscopia, hipotireoidismo descontrolado ou controlado a menos de um ano, pacientes com cirurgias orofaríngeas prévias, pacientes sindrômicos (Síndrome de Down), com aparentes deformidades craniofaciais sindrômicas ou adquiridas e história de trismo, fleigmão ou abscesso periamigdaliano.

## **3.2 MÉTODO**

### **3.2.1 AVALIAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA**

1 - POLISSONOGRAFIA NOTURNA COMPLETA: foi realizada em todos os pacientes no pré-operatório, incluindo o grupo controle, avaliando-se os seguintes parâmetros: IAH, saturação mínima da oxiemoglobina e arquitetura do sono, (percentual dos estágios 1, 2, 3 e 4 e do sono REM), e índice de despertar. Os exames de polissonografia foram realizados no Instituto do Sono da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, pelo Sistema Único de Saúde, e no laboratório do sono do Instituto do Coração do HC-FMUSP, utilizando os mesmos critérios polissonográficos descritos a seguir:

Os pacientes realizaram polissonografias assistidas noturnas em laboratórios do sono. Os parâmetros padronizados monitorados em cada exame foram: eletroencefalograma (por eletrodos centrais e occipitais nas posições C4-A1, C3-A2, O2-A1, O1-A2), eletrooculograma (direito e esquerdo), eletromiograma (submentoniano e tibial), eletrocardiograma, fluxo aéreo oronasal (através de cânula nasal), movimentação torácica e abdominal (por pletismografia de indutância não calibrada), saturação da oxi-hemoglobina (por oximetria de pulso), registro da posição no leito e da intensidade dos roncos. As polissonografias foram estagiadas de acordo com critérios padronizados (Rechtschaffen, Kales, 1968), utilizando-se épocas de 30s. As seguintes definições foram utilizadas, de acordo com a American Academy of Sleep Medicine (1999):

- a. Apnéia: cessação da ventilação por pelo menos 10s, subdividida em: (a) apnéia obstrutiva: ausência de fluxo aéreo com persistência de movimentos tóraco-abdominais; (b) apnéia central: ausência de fluxo aéreo e de movimentos tóraco-abdominais e (c) apnéia mista: inicia-se como uma apnéia central e continua como uma apnéia obstrutiva. Todos os tipos de apnéias foram contados na composição do IA (índice de apnéia) e IAH.
- b. Hipopnéia: redução, superior a 50%, na amplitude da curva basal de ventilação ou uma redução desta amplitude em 50% ou menos que esteja associada a uma queda na saturação de oxi-hemoglobina acima de 3% ou associada a um microdespertar, com duração do evento igual ou superior a 10s. A avaliação dos microdespertares seguiu o critério estabelecido pela American Sleep Disorders Association (1992).

2 - AVALIAÇÃO CLÍNICA: foi feita por meio da anamnese e da aplicação da escala de sonolência de Epworth. Ao exame físico, iniciado pela oroscopia, foram determinados a posição do palato e o tamanho das tonsilas palatinas de acordo com a classificação de Friedman. A nasofibrosopia foi realizada com a inclusão da manobra de Muller. O IMC foi calculado dividindo-se a massa do indivíduo pelo quadrado de sua altura em  $\text{kg/m}^2$ .

### 3.2.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

1 - TONSILECTOMIA PALATINA: realizou-se dissecação extra-capsular das tonsilas bilateralmente, com conseqüente exposição do leito muscular da loja amigdaliana. Devido à grande aderência entre a cápsula da tonsila e a musculatura do constritor superior, principalmente no pólo inferior da tonsila, quase sempre ocorreu a remoção de pequena parte desta musculatura aderida às tonsilas palatinas (Erkiliç et al. 2002; Gnepp, Souther 2000). Os pilares tonsilares anteriores e posteriores foram bem preservados.

2 - UVULOPALATOFARINGOPLASTIA: a técnica realizada incluiu tonsilectomia bilateral com preservação dos pilares e a remoção de parte do músculo palatoglosso no ângulo palatofaríngeo, com a tração e sutura do pilar tonsilar posterior sobre o defeito criado no palato mole e parede lateral da faringe, técnica já rotineiramente empregada na Clínica Otorrinolaringológica do HC-FMUSP.

### **3.2.3 AVALIAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR**

O material estudado foi obtido das fibras musculares aderidas às tonsilas palatinas removidas nas cirurgias, sendo majoritariamente o músculo constritor superior da faringe. Foram analisados os componentes da MEC do músculo: as fibras colágenas, elásticas, os proteoglicanos (versican), as metaloproteínas 1 e 2 e a fibronectina através de estudo histológico e morfométrico.

#### **3.2.3.1 PREPARAÇÕES HISTOLÓGICAS E REAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA**

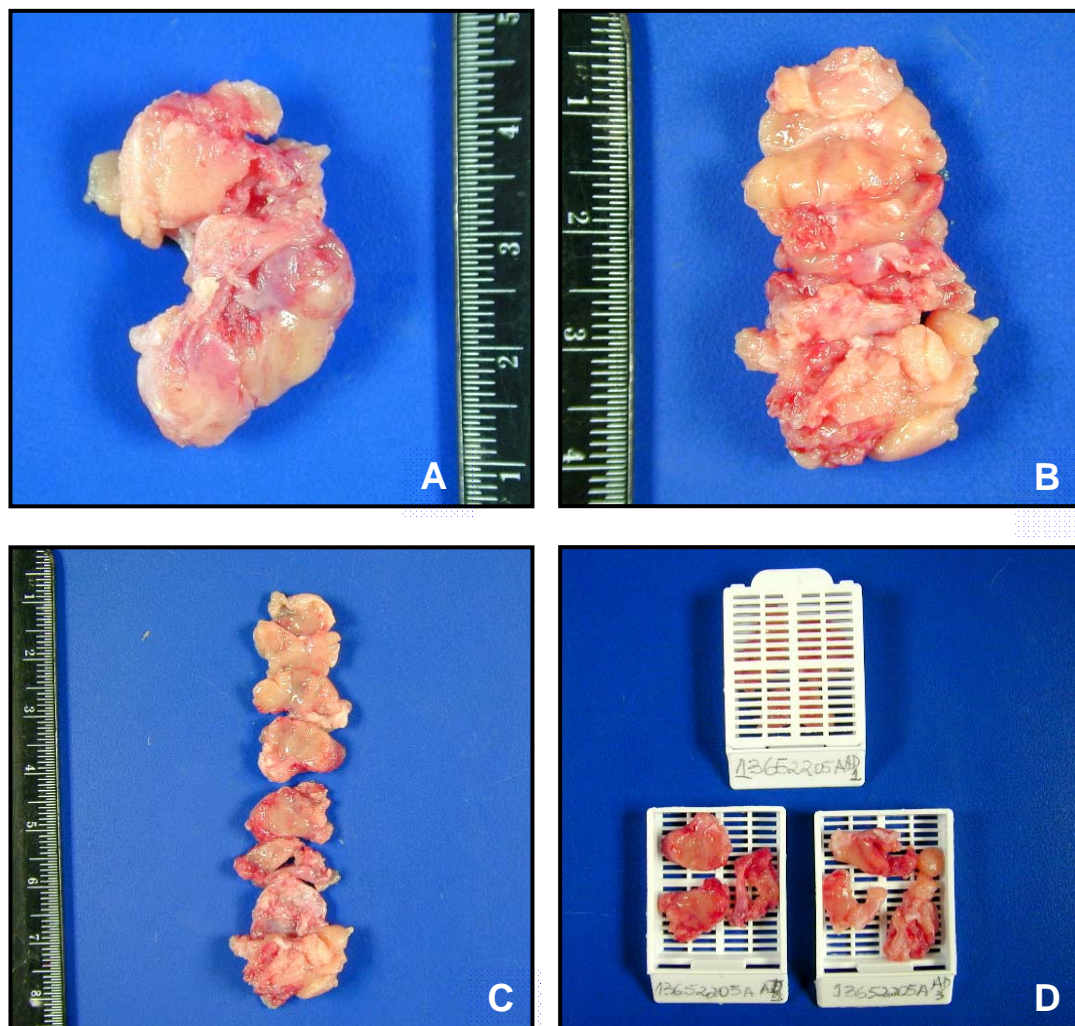
##### **Obtenção dos tecidos**

As tonsilas foram fixadas em formaldeído a 10% por um período de 24 a 48 horas, e então realizados cortes transversais das tonsilas palatinas com espessura de cerca de 0,2cm, compondo múltiplos fragmentos que variam em número de 5 a 20. Os fragmentos foram agrupados em caixetas, constituindo em média 3-4 blocos por caso (Figura 1.). Após a fixação, foram desidratados em concentrações alcoólicas (etanol e xilol) progressivas (70-95%), diafanizados e embebidos em parafina. Em seguida os blocos foram submetidos a cortes histológicos de 4µm de espessura para preparação das lâminas para cada coloração específica. Previamente à execução das diversas colorações as lâminas foram desparafinizadas com banhos de etanol e xilol, água corrente e/ou água destilada.

## Histoquímica

HEMATOXILINA E EOSINA: utilizada para avaliar previamente às outras colorações, se o espécime de musculatura foi adequado para o estudo das MEC (quantidade suficiente de musculatura e ausência de artefatos, como sangramento e cauterização).

RESORCINA-FUCSINA DE WEIGERT com oxidação prévia: empregado método habitual, com identificação das fibras elásticas (Montes, 1996).



**FIGURA 1** - Preparação das tonsilas palatinas após ressecção. 1A. Tonsila palatina em sua face interna. 1B, 1C. Secção transversal da tonsila palatina, visão dos fragmentos. 1D. Agrupamento dos fragmentos em caixetas identificadas

PICROSSÍRIUS – POLARIZAÇÃO: utilizado o Sirius red F3BA e após a coloração, cada lâmina foi exposta à luz polarizada e identificado o tipo de colágeno predominante, ao microscópio óptico (Montes, Junqueira, 1988; Montes, Junqueira, 1991)

### **Reações de imunohistoquímica**

Foram utilizados para caracterização do colágeno I, colágeno III, versican, MMP-1, 2 e fibronectina na musculatura da parede lateral da faringe e obedeceram ao seguinte protocolo:

- Fixação das lâminas com 3-aminopropyltriethoxysilane (A3648, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) para evitar descolamento do tecido.
- Desparafinização e bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10v a 3% por 7 vezes de 4 minutos, em seguida os cortes foram reidratados e lavados com água destilada.
- Recuperação antigênica, obtida pelo método da tripsina por 20 minutos para o colágeno tipo I, III e versican e através de alta temperatura em tampão de citrato, PH 6,0 para a MMP 1, 2 e fibronectina.
- Incubação com anticorpo primário:

Os cortes foram incubados com os seguintes anticorpos primários diluídos em 1% de albumina sérica bovina (BSA) em fosfato (PBS), após lavagem salina tamponada com PBS: anti-colágeno tipo I de coelho com diluição 1:50 (T59103R, Biodesign Internacional, ME, EUA), anticorpo monoclonal contra colágeno III com diluição 1:500 (CP19L, Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA, EUA), anticorpo monoclonal anti- humano

contra versican na diluição 1:100 (270428-1, Seikagaku Corporation, Tokyo, JPN), anticorpo anti-MMP-1 de rato na diluição de 1:2000 (IM35L, Calbiochen, CA, EUA), anticorpo contra MMP-2 na diluição de 1:100 (MS806P, Neo Markers, Fremont, CA) e anticorpo contra fibronectina na diluição 1:8000 (0245, Dako Cytomation, EUA). Os anticorpos primários foram aplicados sobre os cortes e os controles, positivo e negativo e as lâminas incubadas overnight.

- Incubação com anticorpo secundário:

As lâminas foram incubadas por 1 hora e 30 minutos pelo Sistema Envision de amplificação de sinal com polímero Dual Link de coelho e camundongo (K4061-1, Dako Cytomation, Dinamarca) para o colágeno tipo I, enquanto que para os outros marcadores (colágeno III, versican, MMP1, MMP2 e fibronectina) foi utilizado o kit LSAB, com incubação de 1 hora para o anticorpo biotilado e 30 minutos para o complexo HRP de coelho e camundongo (K0690-1, Dako Cytomation, Dinamarca) em estufa a 37°. Após esta etapa os anticorpos foram detectados por meio da revelação com o cromógeno 3,3 Diaminobenzidine (DAB) (D5637, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e apenas para a MMP2 foi usado o cromógeno DAB líquido (K3468, Dako Cytomation, EUA) por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente e submetidas a contra-coloração com hematoxilina de Harris por 30 minutos.

OBS: após cada etapa realizou-se 3 lavagens em PBS de 3 minutos.



As reações de imunohistoquímica para cada marcador foram executadas em todos os casos em um único momento, visando a obtenção de um mesmo padrão na totalidade dos casos.

### **3.2.3.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA**

A densidade dos componentes da MEC presentes no endomísio da musculatura da parede lateral da faringe foram quantificados por meio de análise de imagens, usando o Software Image-Pro® Plus 4.1 for Windows® (Media Cybernetics-Silver Spring, MD, EUA), conectado a uma câmera digital (JVC TK-C1380 Color Video Camera, Victor Company of Japan Limited, Japão) acoplado a um microscópio de luz (Leica DMR, Leica Microsystems, Wetzlar GmbH, Alemanha) (Figura 2). Os espécimes foram analisados no maior aumento (400x).

As mensurações foram realizadas por um observador cego para os grupos em estudo. Obtivemos os dados de cada caso pela média da análise de 15 campos por cada coloração por paciente. Os valores foram expressos em percentagem (%) de área proporcional positiva para determinado elemento da MEC em relação à área total de músculo, analisado em ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ ). Foi avaliado todo o tecido muscular presente no corte de cada espécime.



**FIGURA 2** - Foto do analisador de imagem, Software Image-Pro® Plus 4.1 for Windows®, conectado a uma câmera digital acoplado a um microscópio de luz.

### 3.2.4 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em medianas e intervalos interquartis. A análise estatística foi realizada com o software SPSS versão 15.0 (SPSS Inc.®, Chicago, Illinois, EUA). A distribuição das variáveis do estudo foi não paramétrica (segundo o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov). Para a comparação entre grupos, utilizamos os testes de Mann-whitney e Kruskal-Wallis. Para correlacionar as variáveis clínicas com os elementos da MEC, utilizamos o teste de correlação de Spearman. Consideramos o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **4 RESULTADOS**

---

As características clínicas e polissonográficas dos três grupos encontram-se na tabela 1. O grupo SAOS apresentou idade significativamente maior que os controles ( $p = 0,02$ ) e IMC maior que os controles ( $p = 0,001$ ) e que os roncadores ( $p = 0,001$ ). Não houve diferença estatística quanto a idade e IMC entre os subgrupos com SAOS. A saturação mínima de oxihemoglobina foi significativamente menor no grupo apnéia do que nos controles ( $p = 0,007$ ) e nos roncadores ( $p = 0,018$ ).

**TABELA 1** - Dados Clínicos e polissonográficos dos três grupos de pacientes <sup>(1)</sup>

DADOS CLÍNICOS	GRUPOS		
	Controles	Roncadores	SAOS
Sexo (M/F)	7/7	10/8	19/10
Idade (anos)	26 (13)	34 (25)	40 (16)*
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	23.05 (5)	24.5 (3)	28 (4)**
IAH (eventos/hora)	0.8 (2,3)	4.9 (6,4)	18.5 (18,2)***
O <sub>2</sub> Mínimo	89 (5)	88 (8)	82 (12)****

NOTA: IMC = índice de massa corpórea; IAH = índice de apnéia-hipopnéia, O<sub>2</sub> mínimo = saturação mínima de oxihemoglobina

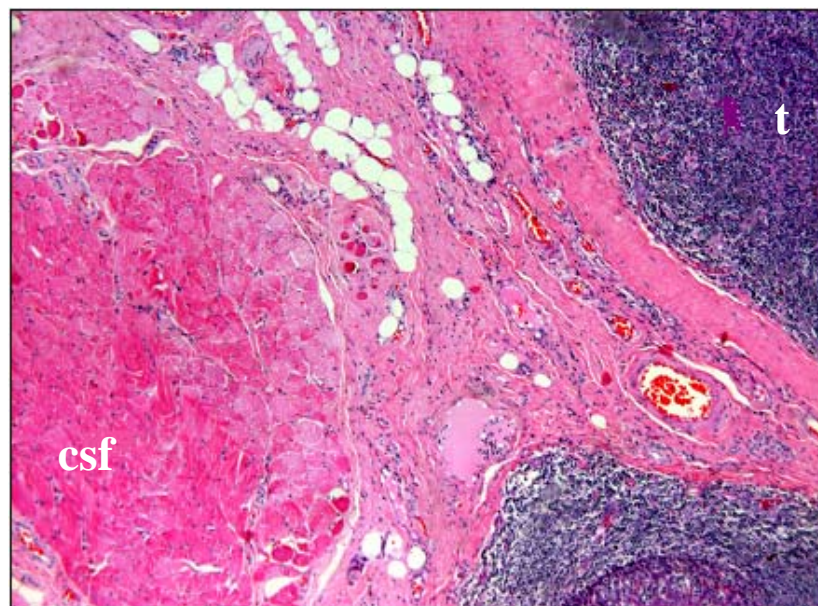
<sup>(1)</sup> Dados expressos pela mediana (intervalo interquartil)

\*  $P = 0,02$  em relação aos controles, \*\* $p = 0,001$  em relação aos controles e roncadores, \*\*\*  $p = 0,0001$  em relação aos controles e roncadores, \*\*\*\* $p = 0,018$  em relação aos roncadores e controles

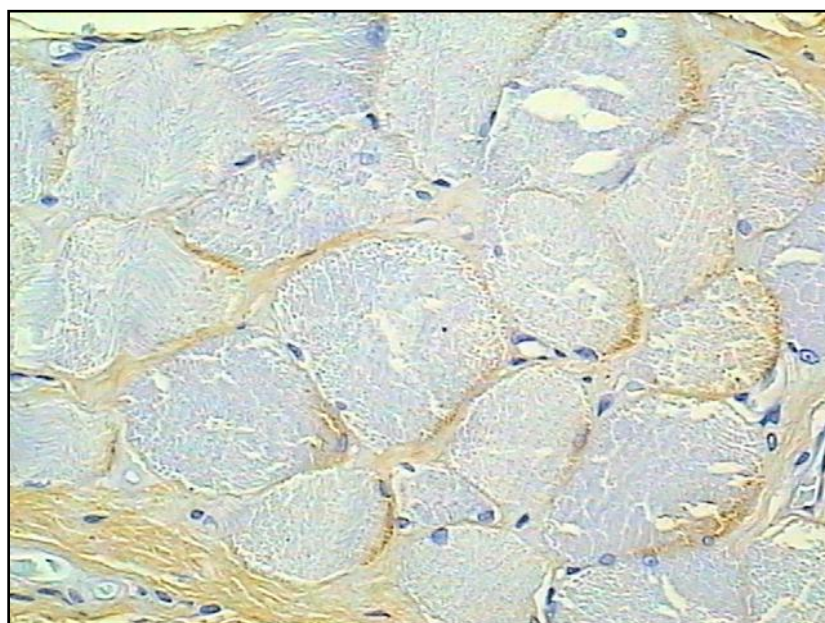
Em uma análise descritiva das lâminas, observamos que o CSF se mostrava aderido às tonsilas palatinas. Não foram observados sinais de inflamação em nenhum dos casos analisados (Figura 3). Os diferentes componentes da MEC revelaram

pequena quantidade de MEC no endomísio do CSF. O colágeno sendo o componente mais abundante, em especial o colágeno tipo I (Figura 4, 5). As fibras colágenas, na histoquímica se organizavam em delgadas fibras que revestiam as células musculares individualmente e ainda em pequenas pontes que ligavam as células entre si e com a MEC (Figura 6).

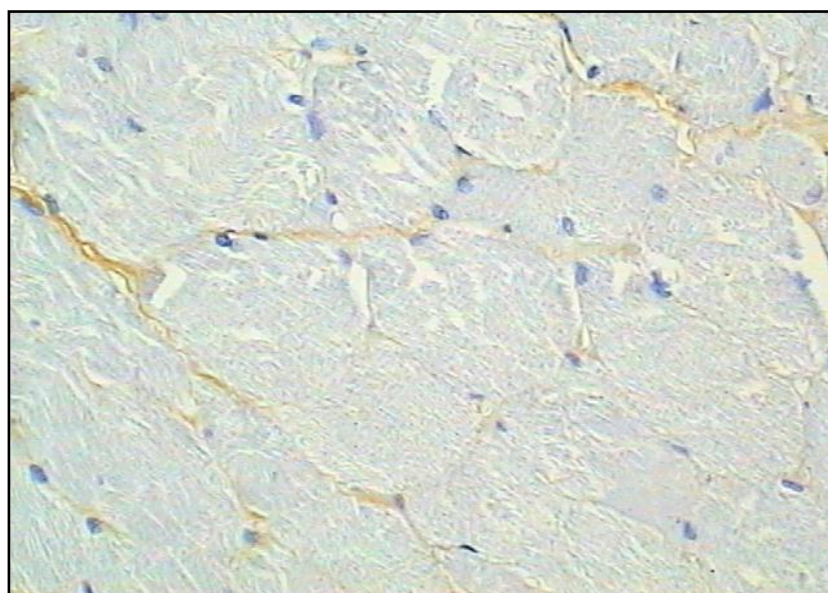
As fibras elásticas encontravam-se em pequena quantidade no endomísio e sua arquitetura era semelhante à das fibras colágenas (Figura 7). A metaloproteinase tipo 1 mostrou uma expressão bastante variável e irregular tanto entre os casos, como numa mesma fibra muscular (Figura 8). Não foi observada a presença de metaloproteína tipo 2 no CSF em nenhum dos casos. O versican (Figura 9) e a fibronectina (Figura 10), foram os componentes mais escassos na MEC do endomísio. Todos os componentes e a própria MEC apareciam em maior concentração no perimísio do que no endomísio (Figura 11).



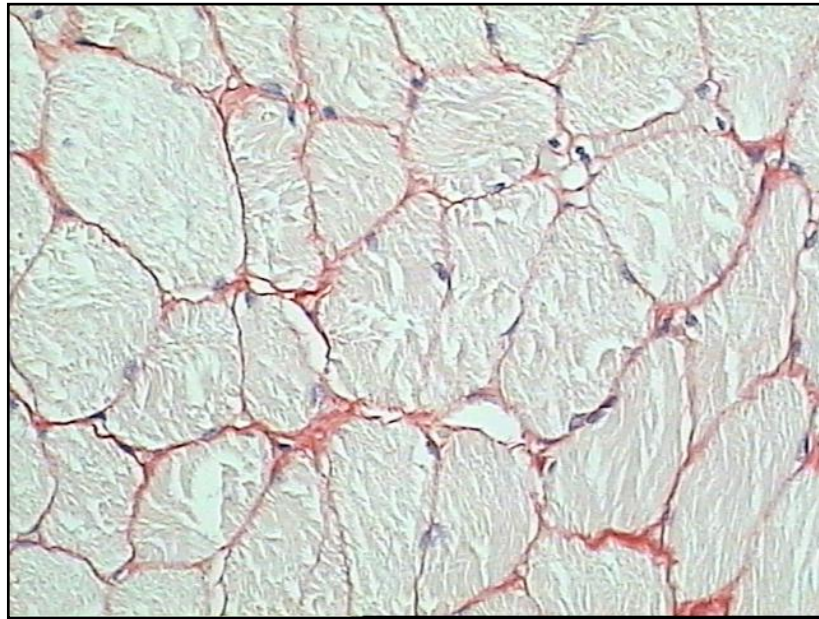
**FIGURA 3** - Corte histológico corado com Hematoxilina e eosina, mostrando que o músculo (CSF) encontra-se aderido à tonsila palatina. Observa a ausência de inflamação. csf = constritor superior da faringe t = tonsila



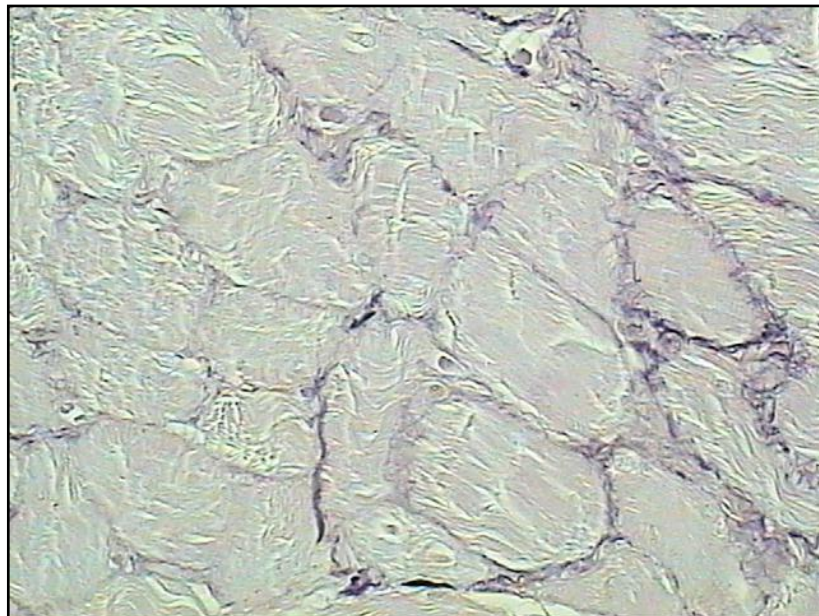
**FIGURA 4** - Corte histológico transversal de imunohistoquímica mostrando o colágeno I (coloração em marrom)



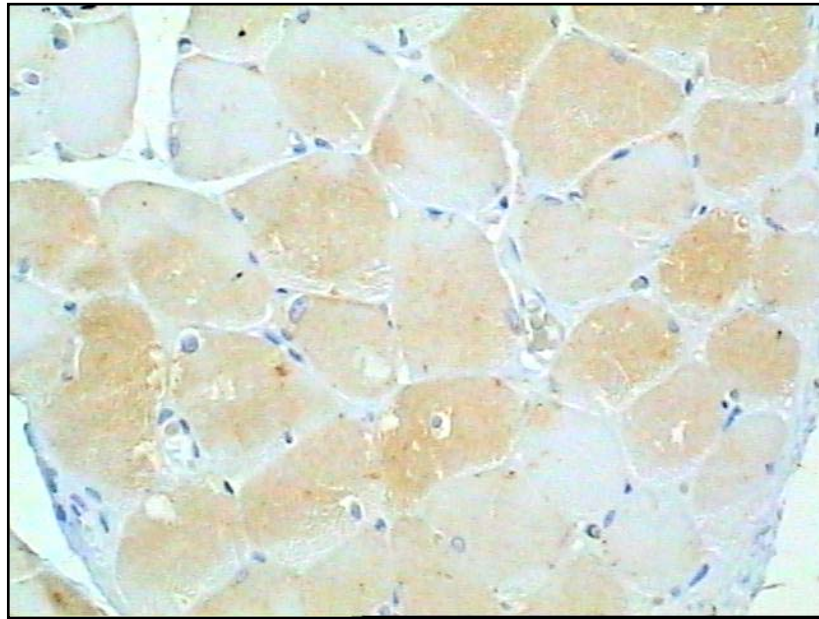
**FIGURA 5** - Corte histológico transversal de imunohistoquímica mostrando o colágeno III (coloração em marrom)



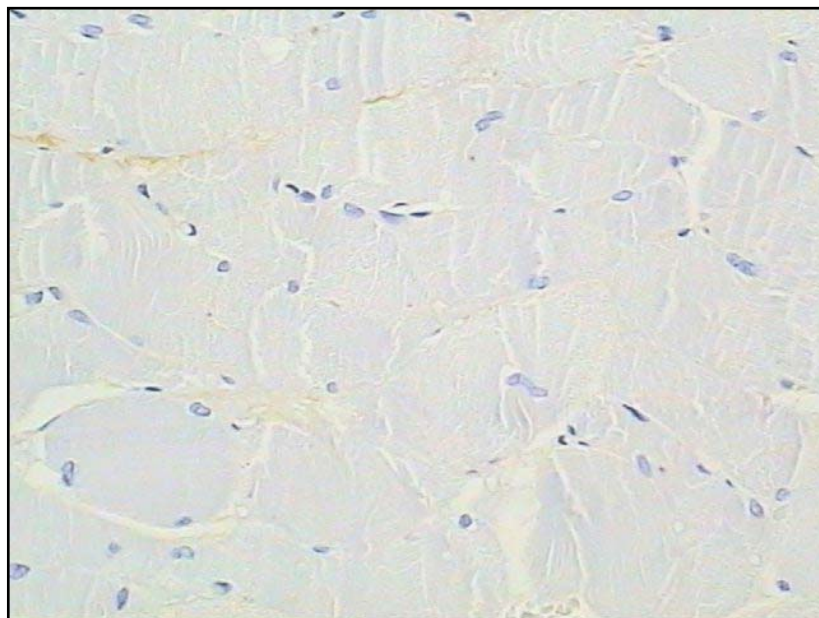
**FIGURA 6** - Corte histológico transversal corado com Picrosirius-polarização mostrando a distribuição do colágeno total no endomísio (delgadas fibras que revestiam as células musculares individualmente e ainda em pequenas pontes que ligavam as células entre si e com a MEC)



**FIGURA 7** - Corte histológico transversal corado com Resorcina fucsina da Weigert com oxidação prévia, mostrando a distribuição das fibras elásticas no endomísio (delgadas fibras que revestiam as células musculares individualmente e ainda em pequenas pontes que ligavam as células entre si e com a MEC)

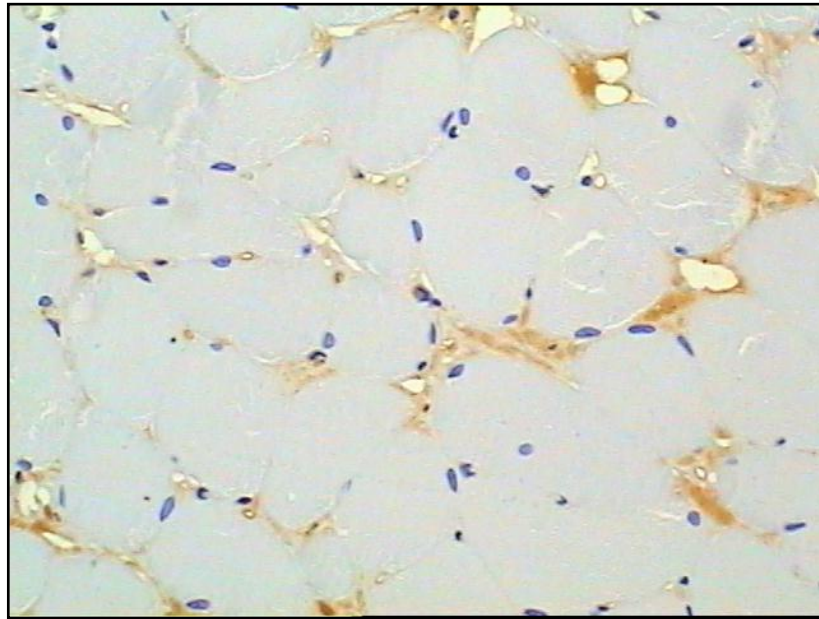


**FIGURA 8** - Corte histológico transversal de imunohistoquímica mostrando a MMP-1 (coloração em marrom). Note a variabilidade da expressão da MMP-1 na mesma fibra muscular

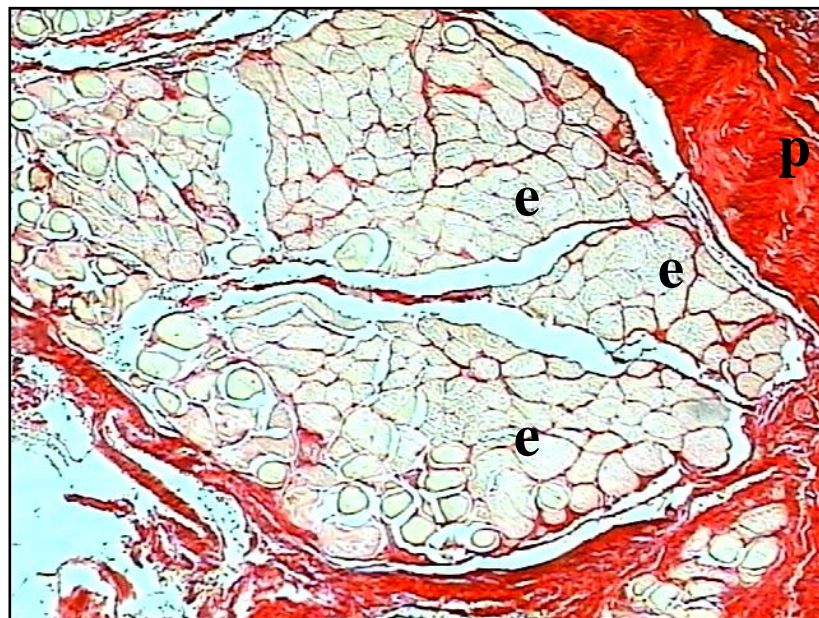


**FIGURA 9** - Corte histológico transversal de imunohistoquímica mostrando o versican (coloração em marrom)





**FIGURA 10** - Corte histológico transversal de imunohistoquímica mostrando a fibronectina (coloração em marrom). Observa que estes dois últimos componentes são os mais escassos na MEC do endométrio



**FIGURA 11** - Corte histológico corado com Picrosirius-polarização em menor aumento (100x), mostrando a maior concentração de MEC no perimísio em relação ao endométrio. e = endométrio p = perimísio

Na análise histoquímica e imunohistoquímica da área proporcional dos componentes da MEC, não houve diferença significativa entre os três grupos para nenhum elemento (tabela 2). Obtivemos resultados semelhantes ao realizar a mesma análise por subgrupos com SAOS (leve, moderado e grave).

**TABELA 2** - Área proporcional da MEC do endomísio na parede lateral da faringe em controles, roncoadores primários e SAOS <sup>(1)</sup>

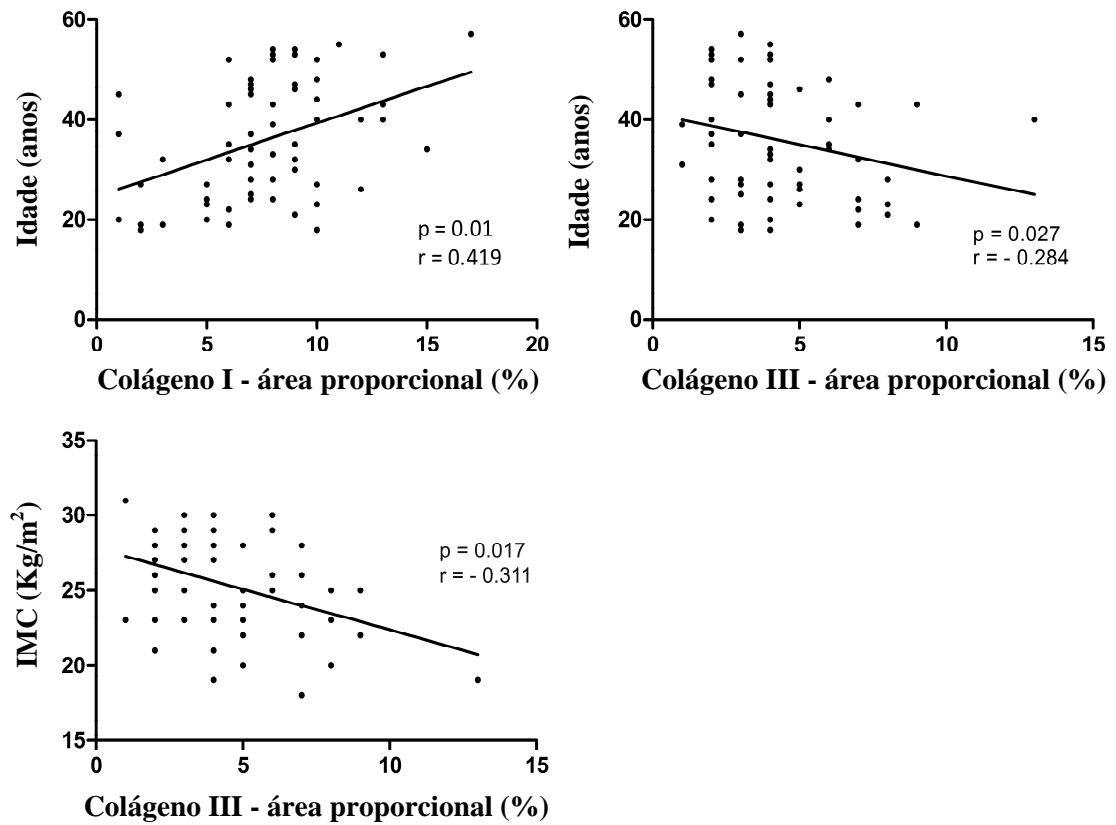
COMPONENTES DA MEC	ÁREA PROPORCIONAL (%)			
	Controles	Roncoadores	SAOS	p*
Colágeno Total	1,3 (0,01)	1,44 (0,01)	1,78 (0,01)	0,37
Fibras elásticas	0.68 (0.01)	0.47 (0.00)	0.69 (0.01)	0.32
Colágeno tipo I	6.33 (0.05)	7.83 (0.03)	7.9 (0.03)	0.33
Colágeno tipo III	3.98 (0.04)	3.69 (0.03)	3.67 (0.03)	0.45
MMP – 1	6.18 (0.08)	4.76 (0.07)	3.69 (0.07)	0.79
Versican	0.32 (0.01)	0.18 (0.00)	0.21 (0.01)	0.10
Fibronectina	0.6 (0.01)	0.75 (0.01)	0.72 (0.01)	0.57

NOTA: MEC = extracellular matrix, MMP-1 = matrix metalloproteinase-1, p = nível de significância p<0,05

<sup>(1)</sup>Dados expressos pela mediana (intervalo interquartil)

Uma significativa correlação foi observada entre a idade e a quantidade do colágeno tipo I ( $r = 0,419$ ,  $p = 0,01$ ), e inversa entre a idade e o colágeno tipo III ( $r = -0,284$ ,  $p = 0,027$ ) (Gráfico 1). O IMC correlacionou-se inversamente com o colágeno tipo III ( $r = -0,311$ ,  $p = 0,017$ ). As demais correlações e comparações entre a área proporcional das proteínas da MEC com os dados clínicos (idade, IMC) não foram significantes.

GRÁFICO 1 - Correlação entre idade e colágeno I e III. Existe uma significativa e positiva correlação entre idade e o colágeno I e uma correlação negativa entre idade e colágeno III e inversa com IMC e colágeno III



NOTA:  $r$  = coeficiente de correlação,  $p$  = nível de significância  $p < 0,05$

## **5 DISCUSSÃO**

---

O presente estudo nós analisamos a composição da MEC e seus reguladores no endomísio do músculo constritor superior da faringe em pacientes controles, roncoadores e SAOS. A composição do colágeno da MEC foi relacionado à idade e IMC dos pacientes. Não observamos diferenças em nenhum componente da MEC entre os três grupos, sugerindo que a MEC do endomísio não é a responsável pela progressiva disfunção estrutural da musculatura da parede lateral da faringe em roncoadores e SAOS.

Até o momento no nosso conhecimento não existem estudos que quantifiquem a MEC na musculatura da faringe. E de maior importância é que o nosso estudo não avalia o tecido mucoso ou muscular de revestimento da faringe, mas sim o seu componente muscular estrutural.

Algumas alterações histológicas já foram identificadas em pacientes com SAOS e roncos, como inflamações em mucosa e musculatura superficial (Woodson et al. 1991; Boyd et al. 2004; Sériès et al., 2004; Paulsen et al., 2002; Sekosan et al., 1996) e sinais de lesões neurogênicas na musculatura da orofaringe (Boyd et al., 2004; Friberg et al., 1998) e apenas um estudo relatou alteração qualitativa da MEC nos pacientes com SAOS e roncos (Sériès et al., 2004). A composição da MEC da parede lateral da faringe pode ter um importante papel em determinar a atividade e função celular (Labat-Robert, 1988).

Neste estudo nós mostramos que o colágeno I foi o componente mais abundante do músculo CSF, em concordância com outros estudos de músculo esquelético em humanos, onde o colágeno I mostrou uma proporção de 80% dentre

os outros tipos de colágeno (Korusu, 1979). Observamos ainda, uma correlação positiva significativa entre a idade e o aumento de colágeno tipo I e uma correlação negativa entre a idade e o colágeno tipo III. Prévios estudos de alterações do músculo esquelético cardíaco relacionadas à idade também mostraram uma maior concentração de colágeno I e uma redução no colágeno tipo III (Souza, 2000; Mays et al., 1988). Estas alterações podem ter consequências funcionais, levando a um aumento da rigidez, causando disfunção na contratilidade muscular (Souza, 2000).

Neste estudo excluimos pacientes obesos, a fim de excluir o fato já conhecido que a obesidade é um fator de risco independente para SAOS. Apesar disso, foi encontrado neste estudo uma correlação inversa entre o IMC e colágeno tipo III ( $r = -0,311$ ,  $p = 0,017$ ), semelhante ao que ocorre com a idade. Há relato de que a obesidade modifica o *turnover* do colágeno no músculo esquelético cardíaco, podendo alterar sua funcionalidade (Quilliot et al., 2005).

As fibras elásticas são importantes componentes nos tecidos que contém propriedades elastoméricas, conferindo uma grande capacidade de deformabilidade e recolhimento passivo aos tecidos sem o gasto de energia (Kielty et al., 2002). Um estudo qualitativo reportou desorganização das fibras elásticas ao redor do músculo da úvula em pacientes com SAOS. Estas alterações foram menos evidentes do que na mucosa da úvula e não obtiveram correlações funcionais significantes (Sériès et al., 2004). No presente estudo detectamos uma pequena quantidade de fibras elásticas no endomísio do CSF e não observamos qualquer diferença entre os grupos, ou alterações relacionadas à idade. É possível que estes achados sejam reflexo da configuração anatômica e da funcionalidade deste músculo, no qual não ocorre estiramento importante durante a deglutição.

A fibronectina e o versican estiveram presentes em pequena proporção no endomísio do CSF em todos os grupos estudados. A MMP-1 apresentou, nas células musculares do CSF, uma expressão variável tanto entre os casos como em uma mesma fibra muscular e não diferiram entre os grupos. Alterações no conteúdo destas proteínas no músculo esquelético parecem estar relacionadas a condições patológicas como miopatias inflamatórias ou distróficas e desnervação muscular (Foidart et al., 1981; Salonen et al., 1985; Fadic et al., 1990; Kieseier et al., 2001; Zanotti et al., 2007).

Embora a inflamação da mucosa da orofaringe tenha sido detectada em pacientes com SAOS, nós não detectamos infiltração de células inflamatórias significantes ao nível do CSF, nem alterações na MEC que sugiram inflamação. Doenças inflamatórias musculares alteram o equilíbrio de MEC. Boyd et al. (2004) demonstraram o aumento de células inflamatórias não só na mucosa, mas também na musculatura do palato mole e dos pilares tonsilares. Neste caso no entanto, a inflamação do músculo foi apenas 1/5 da contagem de células inflamatórias encontradas na mucosa. Outros autores têm identificado infiltração de células inflamatórias, na musculatura da orofaringe de pacientes com SAOS (Woodson et al. 1991; Boyd et al. 2004; Sériès et al., 2004), principalmente em músculos topograficamente mais superficiais na orofaringe, como úvula, palato mole e pilares tonsilares. Acreditamos que a inflamação possivelmente extravasou da mucosa para estes músculos mais superficiais e não para os músculos localizados mais profundamente na orofaringe como o CSF, alvo da nossa investigação. Vale salientar que o nosso trabalho apenas quantificou a MEC e descreveu os achados das lâminas, sem utilizar marcadores específicos inflamatórios, por isso o que consideramos é que se houve processo inflamatório nos nossos casos, não chegou a alterar quantitativamente a MEC.

A desnervação motora da musculatura do palato mole e dos pilares tonsilares tem sido envolvida na patogênese da SAOS (Boyd et al., 2004; Friberg et al., 1998). Woodson et al. (1991) reportaram desmielinização em úvula de pacientes com SAOS e roncos e ainda Friberg et al. encontraram alterações morfológicas, com fibras do músculo palatofaríngeo atroficas nos pacientes com SAOS, considerados sinais indiretos de desnervação (Friberg et al., 1998). Estudos em ratos submetidos a desnervação motora mostraram um acúmulo de colágeno tipos I e III (Sawai, 1982; Tsuji, 1989), de fibronectina (Salonen et al., 1985) e ainda um aumento de proteoglicanos (Fadic et al. 1990). No nosso estudo não houve acúmulo de qualquer destes componentes da MEC. Entendemos, dessa forma, que a desnervação nos pacientes roncadores e SAOS, se presente não levou a alterações na MEC.

As fibras musculares foram fontes de estudos, sendo detectadas alterações funcionais do tipo de fibra muscular nos músculos genioglosso, no constritor médio da faringe e também no músculo da úvula nos pacientes com SAOS (Carrera et al., 1999; Ferini-Strambi et al., 1998; Sériès et al., 2000; Lindman, Stal, 2002). Estas alterações se mostraram reversíveis no músculo genioglosso após o tratamento da SAOS (Carrera et al., 1999), justificando uma adaptação à nova atividade e contração vigorosa aos quais são submetidos os músculos da faringe para vencer o colapso. Estas alterações são consideradas consequência e não causa da SAOS. Imaginamos que ocorra um mecanismo de forma semelhante no músculo constritor superior.

É improvável que os nossos resultados tenham sido afetados por erros metodológicos. Até o nosso conhecimento este é um dos estudos com mais ampla casuística incluindo análise histológica da musculatura profunda da faringe em



grupos de pacientes bem caracterizados, controles, roncoadores e pacientes com SAOS. Nós utilizamos análise de imagens para determinar os componentes da MEC e MMP em cortes histológicos, evitando a subjetividade de uma análise semiquantitativa. Nós analisamos as fibras musculares aderidas à face externa das tonsilas palatinas, o que tem sido já descrito na literatura (Gneep, Souther, 2000; Erkiliç et al., 2002). Acreditamos ser majoritariamente o músculo CSF o foco de nossa análise, já que constitui o principal componente da fossa tonsilar (Ohtsuka et al., 2002). Parte do músculo palatofaríngeo pode em alguns casos formar parte do leito tonsilar (Ohtsuka, 2002), pouco provável nos nossos casos, já que houve grande preocupação na preservação dos pilares tonsilares no ato cirúrgico. Alguns pacientes incluídos no grupo controle apresentavam tonsilites de repetição, contudo tivemos o cuidado de excluir os pacientes com história prévia de fleigmão ou abscesso periamigdaliano, evitando que a musculatura profunda da parede lateral da faringe estivesse envolvida no processo inflamatório. Ademais, não observamos infiltração inflamatória nos controles. Nós não examinamos outros compartimentos do CSF, como o perímísio e epimísio. Nós acreditamos que o endomísio, pelo seu mais íntimo contato com o nível celular (Kovanen, 2002) tenha maior influência nas propriedades funcionais e biológicas das células musculares.

Podemos discutir algumas implicações clínicas dos nossos achados. Alguns tratamentos da SAOS visam não apenas aumentar o espaço da via aérea, com exérese de tecidos moles, como também produzir fibrose, como a uvulopalatofaringoplastia e apresenta resultados variáveis (American Sleep Disorders Association, 1996). A faringoplastia lateral, que consiste numa técnica cirúrgica que inclui a manipulação do músculo CSF, apresenta resultados superiores a uvulopalatofaringoplastia,

baseando-se no princípio de reforçar a parede lateral muscular (Cahali, 2003). A ausência de diferença nos componentes da MEC entre controles, roncoadores e apnéicos, sugere que o aumento da fibrose no nível muscular não deve ser relevante no tratamento destas doenças.

Na avaliação descritiva das lâminas, observamos uma arquitetura peculiar das fibras colágenas e elásticas, o que reforça a íntima relação entre a MEC, particularmente do endomísio, e o ambiente celular, além disso provavelmente confere a esta musculatura coesão, força mecânica e capacidade de elasticidade e recolhimento do músculo, fatores essenciais para uma adequada contração muscular.

Interpretamos que um déficit estrutural na musculatura da parede lateral da faringe tem um papel central na gênese da apnéia. Nossos achados sugerem que a MEC do músculo não parece ser o mecanismo predominante desta disfunção estrutural. Schwab et al. encontraram características hereditárias no espessamento da parede lateral de pacientes com SAOS (Schwab et al., 2006). É possível que a patogênese da SAOS tenha um cunho genético, através de mutação nas proteínas essenciais para o funcionamento muscular, por exemplo. Embora nós não tenhamos identificado alterações qualitativas nas fibras elásticas, não podemos excluir a possibilidade de alterações no nível ultraestrutural ocorrerem na SAOS. Cistulli, Sullivan (1993,1995) detectaram uma alta prevalência de SAOS nos pacientes com Síndrome de Marfan, cuja etiologia bem definida encontra-se numa mutação do gene que codifica a fibra elástica, tornando-a funcionalmente defeituosa, e causando flacidez muscular exacerbada e um aumento da colapsibilidade na musculatura da faringe.

Em resumo, a análise histológica da parede lateral da faringe em um amplo grupo de pacientes com distúrbios do sono revelaram que sua composição é relacionada à idade e IMC, mas pode não estar envolvida nos mecanismos que levam ao espessamento e aumento da colapsibilidade da parede lateral da faringe. Mais estudos descrevendo a composição das proteínas do músculo esquelético podem ser úteis no entendimento excessiva complacência observadas nos pacientes com SAOS.

## **6 CONCLUSÕES**

---

- 1- Na análise histoquímica e imunohistoquímica da área proporcional dos componentes da MEC, não houve diferença significativa entre os controles, roncadores e pacientes com SAOS para nenhum elemento estudado;
- 2- Houve uma significativa correlação positiva entre a idade e a quantidade do colágeno tipo I e inversa entre a idade e o colágeno tipo III;
- 3- O colágeno tipo III apresentou uma correlação significativa inversa com o IMC.

## **7 REFERÊNCIAS**

---

American Sleep Disorders Association. EEG arousals: scoring rules and examples. A preliminary report from the sleep disorders atlas task force of the American Sleep Disorders Association. *Sleep* 1992;15:173-84.

American Sleep Disorders Association. Practice parameters for the treatment of obstructive sleep apnea in adults: the efficacy of surgical modifications of the upper airway. *Sleep* 1996;19:152-5.

American Academy of Sleep Medicine. Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. *Sleep* 1999; 22:667-89.

Bode-Lesniewska B, Dours-Zimmermann MT, Odermatt BF, Briner J, Heitz PU, Zimmermann DR. Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. *J Histochem Cytochem* 1996;44:303-12.

Boyd JH, Petrof BJ, Hamid Q, Fraser R, Kimoff RJ. Upper airway muscle inflammation and denervation changes in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:541-6.

Cahali MB. Lateral pharyngoplasty: a new treatment for obstructive sleep apnea hypopnea syndrome. *Laryngoscope* 2003; 113:1961-8.

Cahali MB, Formigoni GGS, Gebrim EMMS, Miziara ID. Lateral pharyngoplasty versus uvulopalatopharyngoplasty: a clinical, polysomnographic and computed tomography measurement comparison. *Sleep* 2004; 27:942-50.

Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* 2004;29:191-7.

Carrera M, Barbé F, Sauleda J, Tomás M, Gómez C, Agustí AGN. Patients with obstructive sleep apnea exhibit genioglossus dysfunction that is normalized after treatment with continuous positive airway pressure. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1960-6.

Cistulli PA, Sullivan CE. Sleep-disordered breathing in Marfan's syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:645-8.

Cistulli PA, Sullivan CE. Sleep apnea in Marfan's syndrome. Increased upper airway collapsibility during sleep. *Chest* 1995;108:631-5.

Cotta-Pereira G, Rodrigo FG, Bittencourt-Sampaio S. Oxytalan, elaunin and elastic fibers in the human skin. *J Invest Dermatol* 1976;66:143-8.

Erkiliç S, Aydin A, Koçer NE. Histological features in routine tonsillectomy specimens: the presence and the proportion of mesenchymal tissues and seromucinous glands. *J Laryngol Otol*. 2002;116:911-3.

Fadic R, Brandan E, Inestrosa NC. Motor nerve regulates muscle extracellular matrix proteoglycan expression. *J Neurosci*. 1990;10:3516-23.

Ferini-Strambi LJ, Smirne S, Moss U, Sferrazza B, Iannacone S. Muscle fiber type and obstructive sleep apnea. *Sleep Res Online* 1998;1:24-7.

Foidart M, Foidart JM, Engel WK. Collagen localization in normal and fibrotic human skeletal muscle. *Arch Neurol* 1981;38:152-7.



Friberg D, Ansved T, Borg K, Carlsson-Norlander B, Larsson H, Svanborg E. Histological indications of a progressive snorers disease in an upper airway muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:586-93.

Friedman M, Ibrahim H, Joseph NJ. Staging of obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome: a guide to appropriate treatment. *Laryngoscope* 2004; 114: 454-9.

Gnepp DR, Souther J. Skeletal muscle in routine tonsillectomy specimens: a common finding. *Hum Pathol* 2000;31:813-6.

Guilleminault C, Hill MW, Simmons FB, Dement WC. Obstructive sleep apnea: electromyographic and fiberoptic studies. *Exp Neurol* 1978;62:48-67.

Gulati AK, Reddi AH, Zalewski AA. Distribution of fibronectin in normal and regenerating skeletal muscle. *Anat Rec* 1982;204:175-83.

Hayashi T, Shimomura H, Terasaki F, Toko H, Okabe M, Deguchi H, Hirota Y, Kitaura Y, Kawamura K. Collagen subtypes and matrix metalloproteinase in idiopathic restrictive cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 1998;64:109-16.

Hollinshead WH: Anatomy of the pharynx and esophagus. In: English GM (ed.): Otolaryngology. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1994, vol. 3, pp 1-21.

Isono S, Remmers JE, Tanaka A, Sho Y, Sato J, Nishino T. Anatomy of pharynx in patients with obstructive sleep apnea and in normal subjects. *J Appl Physiol* 1997; 82:1319-26.

Junqueira LCU, Carneiro J. Biologia celular e molecular. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;2005.

Kannus P, Jozsa L, Järvinen TA, Järvinen TL, Kvist M, Natri A, Järvinen M. Location and distribution of non-collagenous matrix proteins in musculoskeletal tissues of rat. *Histochem J*. 1998;30:799-810.

Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci* 2002;115:2817-28.

Kieseier BC, Schneider C, Clements JM, Gearing AJ, Gold R, Toyka KV, Hartung HP. Expression of specific matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies. *Brain* 2001;124:341-51.

Kovanen V. Intramuscular extracellular matrix: complex environment of muscle cells. *Exerc Sport Sci Rev* 2002;30:20-5.

Kuna ST, Smickley JS. Superior faringeal constrictor activation in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:874-80.

kurosu H. Biochemical studies on collagen and connectin from human skeletal muscle: age-related changes in the properties of elasticity. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1979;53:1641-52.

Labat-Robert J, Robert L. Aging of the extracellular matrix and its pathology. *Exp Gerontol* 1988;3:5-18.

Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. Extracelular matrix. *FEBS Lett* 1990; 268:386-93.

Li KK, Guillemineault C, Riley RW, Powell NB. Obstructive sleep apnea and maxillomandibular advancement: an assessment of airway changes using radiographic and nasopharyngoscopic examinations. *J Oral Maxillofac Surg* 2002;60:526-30.

Lindman R, Stal PS. Abnormal palatopharyngeal muscle morphology in sleep-disordered breathing. *J Neurol Sci.* 2002;195:11-23.

Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J* 1998;12:1075-95.

Mays PK, McAnulty RJ, Campa JS, Laurent GJ. Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. Importance of degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. *Biochem J.* 1991;276:307-13.

Montes GS, Junqueira LCU. Histochemical localization of collagen and of proteoglycans in tissues. In: Nimni ME.. *Collagen*. Boca Raton: CRC Press; 1988, vol 2, pp. 41-72.

Montes GS, Junqueira LCU. The use of the Picrossírius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991;86 Suppl 3:1-11.

Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int.* 1996;20:15-27.

Mosher DF, Furcht LT. Fibronectin: review of its structure and possible functions. *J Invest Dermatol.* 1981;77:175-80.

Nagasse H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274(31):21491-4.

Ohtsuka K, Tomita H, Murakami G. Anatomy of the tonsillar bed: topographical relationship between the palatine tonsil and the lingual branch of the glossopharyngeal nerve. *Acta Otolaryngol* 2002;Suppl.546:99-109.

Paulsen FP, Steven P, Tsokos M, Jungmann K, Müller A, Verse T, Pirsig W. Upper airway epithelial structural changes in obstructive sleep-disordered breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:501-9.

Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteinases and lung injury. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:1109-15.

Quilliot D, Alla F, Böhme P, Bruntz JF, Hammadi M, Dousset B, Ziegler O, Zannad F. Myocardial collagen turnover in normotensive obese patients: relation to insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29:1321-8.

Ramirez F, Gayraud B, Pereira L. Marfan syndrome: new clues to genotype-phenotype correlations. *Ann Med* 1999;31:202-7.

Rechtschaffen A, Kales A. A manual of standardized terminology, techniques and scoring system of sleep stages of human subjects. Los Angeles: Brain Research Institute UCLA, 1968.

Ross R. The elastic fiber: a review. *J Histochem Cytochem* 1973;21:199-208.

Ruoslathi E. Proteoglycans in cell regulation. *J Biol Chem* 1989;264:13369-72.

Salonen V, Lehto M, Kalimo H, Penttinen R, Aro H. Changes in intramuscular collagen and fibronectin in denervation atrophy. *Muscle nerve* 1985;8:125-31.

Sawai H. Collagen metabolism of skeletal muscles following injuries of the peripheral nerves. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zassh* 1982;56:753-64.

Schwab RJ, Gupta KB, Geftter WB, Metzger LJ, Hoffman EA, Pack AI. Upper airway and soft tissue anatomy in normal subjects and patients with sleep-disordered

breathing: significance of the lateral pharyngeal walls. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;125:1673-89.

Schwab RJ, Pack AI, Gupta KB, Metzger LJ, Oh E, Getsy JE, Hoffman EA, Geftter WB. Upper airway and soft tissue structural changes induced by CPAP in normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(4 Pt 1):1106-16.

Schwab RJ, Pasirstein M, Kaplan L, Pierson R, Mackley A, Hachadoorian R, Arens R, Maislin G, Pack AI. Family aggregation of upper airway soft tissue structures in normal subjects and patients with sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:453-63.

Sechler JA, Corbett SA, Wenk MB, Schwarzbauer JE. Modulation of cell-extracellular matrix interactions. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;857:143-54.

Sekosan M, Zakkar M, Wenig BL, Olopade CO, Rubinstein I. Inflammation in the uvula mucosa of patients with obstructive sleep apnea. *Laryngoscope* 1996;106:1018-20

Sériès F, Simoneau J-A, St Pierre S. Muscle fiber area distribution of musculus uvulae in obstructive sleep apnea and non-apneic snorers. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24:410-5.

Sériès F, Chakir J, Boivin D. Influence of weight and sleep apnea status on the immunological and structural features of the uvula. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:1114-9.

Souza RR. Aging of myocardial collagen. *Biogerontology*. 2002;3:325-35.

Takala TE, Virtanen P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports* 2000;10:321-5.

Trudo FJ, Gefter WB, Welch KC, Gupta KB, Maislin G, Schwab RJ. State-related changes in upper airway caliber and surrounding soft-tissue structures in normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1259-70.

Tsuji M. Alterations in collagen synthesis after transection of peripheral nerves. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1989;63:860-70.

Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000;14:2123-33.

Waterlow JC, Garlic PJ, Millward DJ. Protein turnover in the mammalian tissues and in the whole body. Netherlands: *Elsevier/Noth-Holland Biomedical Press*. 1978: 510-27.

Willems IE, Arends JW, Daemen MJ. Tenascin and fibronectin expression in healing human myocardial scars. *J Pathol* 1996;179:321-5.

Woodson BT, Garancis JC, Toohill RJ. Histopathologic changes in snoring and obstructive sleep apnea syndrome. *Laryngoscope*. 1991;101:1318-22.

Yanagishita M. Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn* 1993;43:283-93.

Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 1993;328:1230-5.

Zanotti S, Saredi S, Ruggieri A, Fabbri M, Blasevich F, Romaggi S, Morandi L, Mora M. Altered extracellular matrix transcript expression and protein modulation in primary Duchenne muscular dystrophy myotubes. *Matrix Biol* 2007;26:615-24.

## **Apêndices**

---



## **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10.08.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **559/05**, intitulado: "Estudo matriz extracelular da musculatura da parede lateral da faringe em pacientes com síndrome da apnéia obstrutiva do sono" apresentado pelo Departamento de **OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Drº Michel Burihan Cahali**

Pesquisador (a) Executante: **Drª Danielle Andrade da Silva Dantas**

CAPPesq, 10 de Agosto de 2005.

**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
**Presidente da Comissão de Ética para Análise**  
**de Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP  
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP  
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : [cappesq@hcnet.usp.br](mailto:cappesq@hcnet.usp.br) / [secretariacappesq@hcnet.usp.br](mailto:secretariacappesq@hcnet.usp.br)  
VCN



Manuscript Central

Página 1 de 1

**American Journal of Respiratory  
and Critical Care Medicine/AJRCCM**[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)[Main Menu](#) → [Corresponding Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Danielle Dantas

## Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *American Journal of Respiratory And Critical Care Medicine*.

Manuscript ID: Blue-200902-02840C

Title: EXTRACELLULAR MATRIX OF THE LATERAL PHARYNGEAL WALL IN OBSTRUCTIVE  
SLEEP APNEA SYNDROMEAuthors: Dantas, Danielle  
Mauad, Thais  
Silva, Luiz  
Lorenzi-Filho, Geraldo  
Formigoni, Gilberto  
Cahali, Michel

Date Submitted: 21-Feb-2009

Print Return to Dashboard